

Vergleichende Charakterisierung von Plasmalemma-ATPase aus
salztoleranten und salzsensitiven *Plantago*-Arten

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

angenommene Dissertation

Wolfgang Brüggemann
geb. am 20.10.1956 in Aachen

Oldenburg 1987

Erstreferent: Prof. Dr. P. Janiesch

Korreferent: Prof. Dr. G. Wiegler

Tag der Disputation: 6. 11. 1987

Die hier vorgelegte Arbeit wurde von August 1985 bis August 1987 im Fachbereich Biologie der Universität Oldenburg unter Leitung von Professor Dr. Peter Janiesch angefertigt, dem ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken möchte. Ihm gilt auch mein besonderer Dank für seine Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Weiterhin möchte ich Professor Dr. Pieter Kuiper, Dr. Hidde Prins und Drs. Frans Maathuis (alle Rijksuniversiteit te Groningen) danken. Durch vielfältige Diskussionen und Anregungen hatten sie wesentlichen Anteil am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Dipl. Biol. Petra Moog und Herrn Ralf Dahmen danke ich für die konstruktiven und kritischen Beiträge bei der Fertigstellung des Manuskripts.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die großzügige Finanzierung dieser Arbeit. Die Sachmittel für die Durchführung der Experimente wurden aus dem Fond für die Kooperation der Universität Oldenburg mit der Rijksuniversiteit te Groningen zur Verfügung gestellt.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Physiologische ökologie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die fruchtbaren Diskussionen.

Inhalt

Einführung

1.	Einleitung	1
2.	H ⁺ -ATPasen und andere Transportenzyme bei höheren Pflanzen	4
2.1.	Protonen-ATPasen vom F ₀ -F ₁ -Typ	7
2.2.	Andere pflanzliche membrangebundene Phosphatasen	9
2.3.	Plasmalemma-ATPase	10
2.4.	Untersuchungen an Plasmalemma-ATPase in Zusammenhang mit Salztoleranz	11

Methodenteil

3.	Material und Methoden	13
3.1.	Pflanzenmaterial	13
3.1.1.	Vorkommen der untersuchten Arten am natürlichen Standort	13
3.1.2.	Kultivierung der Versuchspflanzen	14
3.2.	Chemikalien	15
3.3.	Isolation von Membranvesikeln	15
3.4.	Dichtegradientenzentrifugation	16
3.5.	Wäßriges Zweiphasensystem nach Lundborg et al. (1981) und Yoshida et al. (1983)	16
3.6.	Solubilisation von Membranproteinen	17
3.7.	Enzymatische Analysen	17
3.8.	Berechnung der aktuellen MgATP ²⁻ -Konzentration	19
3.9.	Gaschromatographie	21
3.10.	Atomabsorptionsspektrometrie	22
3.11.	Chloridbestimmung	22
3.12.	Gelelektrophorese	23

Ergebnisse und Diskussion

4.	Isolation von Plasmalemma aus differenziertem Gewebe von <i>Plantago</i> -Arten	25
4.1.	Charakterisierung von löslicher Phosphataseaktivität	26
4.2.	Isolation von Plasmalemma aus <i>Plantago</i> -Arten	29

4.2.1.	Dichtegradientenzentrifugation	30
4.2.1.1.	Verteilung von Markerenzymen im Dichtegradienten	32
4.2.1.2.	ATPase-Hemmung durch Inhibitoren und pH-Profile der ATPase in den Fraktionen aus dem Dichtegradienten	33
4.2.1.3.	Substratspezifität der Phosphatase in den Fraktionen aus dem Dichtegradienten	36
4.2.1.4.	Bewertung der Methode	37
4.2.2.	Wäßriges Zweiphasensystem nach Lundborg et al. (1981) und Yoshida et al. (1983)	38
4.2.2.1.	Verteilung von ATPase und Protein aus "crude microsomes" in Zweiphasensystemen unterschiedlicher Zusammensetzung	38
4.2.2.2.	Verteilung von Markerenzymen auf die Phasen des Zweiphasensystems	40
4.2.2.3.	Einfluß von Phosphatase-Inhibitoren auf die ATPase-Aktivität in Membranen aus dem Zweiphasensystem	41
4.2.2.4.	Substratspezifität der ATPase-Aktivität in Membranen aus dem Zweiphasensystem	42
4.2.2.5.	Orientierung der Plasmalemmavesikel	43
4.2.2.6.	Bewertung der Methode	44
5.	Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase aus unterschiedlich salztoleranten <i>Plantago</i> -Arten	49
5.1.	Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase unter nicht salinen Kulturbedingungen	49
5.1.1.	Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitor-Wirkung	49
5.1.2.	pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität	50
5.1.3.	Substratspezifität	52
5.1.4.	Einfluß zweiwertiger Kationen auf die ATPase-Aktivität	53
5.1.5.	Einfluß von Anionen und einwertigen Kationen	54
5.1.6.	Kinetik der ATPase-Reaktion	59
5.1.7.	Diskussion der Ergebnisse und Schlußfolgerungen aus der Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase	61
5.2.	Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase unter salinen Kulturbedingungen	71
5.2.1.	Der Einfluß von salinen Kulturbedingungen auf den physiologischen Zustand von <i>Plantago crassifolia</i>	71
5.2.2.	Reinheit der Plasmalemma-Vesikel aus Wurzeln salzbehandelter <i>P. maritima</i>	74

5.2.3.	pH-Abhängigkeit der Plasmalemma-ATPase	75
5.2.4.	Substratspezifität	77
5.2.5.	Reaktionskinetik der ATPase	78
5.2.6.	Salzstimulation der ATPase	78
5.2.7.	Diskussion	80
6.	Untersuchungen an solubilisierter ATPase	83
6.1.	ATPase aus <i>P.coronopus</i>	85
6.2.	ATPase aus <i>P.major</i>	87
6.3.	ATPase aus <i>P.lanceolata</i> , <i>P.maritima</i> und <i>P.crassifolia</i>	89
6.3.1.	pH-Optima der mit Lysophosphatidylcholin löslichen ATPase	91
6.3.2.	Substratspezifität	93
6.3.3.	Reaktion der solubilisierten ATPase auf Hemmstoffe	94
6.3.4.	Kinetische Analysen der solubilisierten ATPase	95
6.3.5.	Elektrophoretische Untersuchungen	97
6.4.	Diskussion	99
7.	Zur Rolle der Plasmalemma-ATPase in der Kontrolle der NaCl-Aufnahme in halophytischen <i>Plantago</i> -Arten	105
	Zusammenfassung	111
	Literatur	114
	Abkürzungen	124
	Abbildungsverzeichnis	125



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

Mit dem Begriff "Halophyten" werden diejenigen Pflanzen bezeichnet, die die natürliche Vegetation salzbeeinflusster Standorte bilden (Flowers 1985, Napp-Zinn 1984). Dies sind in unseren Breitengraden insbesondere die Salzwiesen und Spülsäume der Meeresküsten, kleinere Binnenlandsalzstellen, und einige Flächen am Neusiedler See. Die hier vorkommenden Pflanzen weisen eine Reihe morphologisch-anatomischer und physiologischer Anpassungserscheinungen an den Standortfaktor Bodensalinität auf. An morphologischen Besonderheiten sind z.B. Sukkulenz, starke Behaarung und Rollblätter zu nennen. Zur Verringerung des Salzgehaltes des Sprosses gibt es spezifische Adaptationen, wie die Entwicklung von Organen zur Salzabscheidung (Salzdrüsen, Blasenhaare) und die Translokation von Salz in ältere Blätter oder Sproßteile, die abgeworfen werden.

Die in der Bodenlösung vorhandenen Ionen erzeugen ein osmotisches Potential, das erheblichen Einfluß auf die Wasseraufnahme von höheren Pflanzen hat. So weist die Bodenlösung in Bereichen, in denen beispielsweise *Salicornia europaea* hohe Bestandsdichten erreicht, mit 600 mM NaCl ein Wasserpotential von ca. - 24 bar auf, das bei Austrocknung noch weiter absinken kann. Um unter diesen Bedingungen Wasser aufzunehmen, müssen die Pflanzen entsprechend niedrige Wasserpotentiale in ihren Geweben aufbauen. In krautigen Halophyten wurden Werte um - 50 bar gemessen (Ziegler 1978), die aus der Akkumulation osmotisch wirksamer Substanzen resultieren. Bis zu 90 % des in Preßsäften gemessenen osmotischen Potentials werden von NaCl beigesteuert, das in der Bodenlösung unbegrenzt zur Verfügung steht und somit ein leicht zugängliches Osmotikum darstellt. Die Konzentration dieses Salzes kann beispielsweise in Blättern von *Atriplex nummularia* auf 870 mM ansteigen (Flowers 1985).

Da hohe Na^+ -Konzentrationen auf viele Proteine denaturierend wirken und dadurch die Aktivität vieler Enzyme hemmen, nahm man zunächst an, daß Halophyten spezifisch adaptierte Enzyme besitzen, wie sie von halophilen Bakterien bekannt sind (Larsen

1967). Diese Vermutung wurde jedoch von mehreren Arbeitsgruppen widerlegt (Greenway und Osmond 1970, Flowers 1972, und andere). Es zeigte sich vielmehr, daß in den Halophyten das Problem der Na^+ -Toxizität durch Kompartimentierung des Salzes gelöst wird. Nach Röntgenbeugungsanalysen (Gorham und WynJones 1983) konnten jetzt erstmals Matoh et al. (1987) an isolierten Vakuolen aus *Atriplex gmelini* den direkten Beweis erbringen, daß die Vakuole nahezu das gesamte Na^+ der Zelle enthält. Ein gleich hoher osmotischer Wert im Cytoplasma wird durch organische Substanzen aufrechterhalten. Hierzu zählen in verschiedenen untersuchten Arten Prolin (Stewart und Lee 1974), Glycin-Betain (Storey et al. 1977), verschiedene Zucker (Albert und Popp 1977, 1978) und in *Plantago maritima* Sorbitol (Ahmad et al. 1979).

Die Aufnahme fast aller Ionen aus der Bodenlösung in die Wurzel und die Sezernierung dieser Ionen ins Xylem sind von aktiven Transportprozessen abhängig (Ziegler 1978). Geladene Teilchen können den Caspary'schen Streifen in der Endodermis nur auf dem symplastischen Wege passieren. Hierzu ist aktiver Ionentransport über das Plasmalemma von Rindenparenchymzellen notwendig. Auch für den Übertritt der Ionen aus dem Cytoplasma von Xylemparenchymzellen in den Xylemsaft ist aktiver Transport notwendig. Eine Ausnahme hiervon machen diejenigen Ionen, die am Standort in höherer Konzentration vorkommen als in der Wurzel, also z.B. NaCl an salinen Standorten. Unter diesen Bedingungen können Na^+ und Cl^- an den Wurzelspitzen eindiffundieren, da der Caspary'sche Streifen hier noch nicht ausgebildet ist.

Gerade in Bezug auf die Na^+ -Aufnahme wurden an Halophyten wichtige Beobachtungen gemacht. So nimmt beispielsweise die Wurzel des Halophyten *Plantago maritima* bei 1 mM Na^+ im Kulturmedium viermal soviel Na^+ auf wie die des salzintoleranten Verwandten *Plantago media* (DeBoer 1985). Bei hohen Salzkonzentrationen im Außenmilieu sind Halophyten dagegen in der Lage, den Na^+ -Gehalt im Xylem auf einem relativ niedrigen Niveau zu stabilisieren (2.7 bis 6.1 % der Konzentration im umgebenden Medium, Flowers 1985). Dadurch limitieren sie den Ionenfluß von der Wurzel zum Sproß, während es bei salzintoleranten Arten schnell zu einer Überschwemmung des Sprosses mit Na^+ kommt und die Pflanze abstirbt. So akkumuliert *Plantago media* bereits bei 25 mM NaCl im Anzuchtmedium ca. 300 mM Na^+ im Sproß. Dieser Wert wird vom Halophyten

Plantago maritima erst bei 75 mM NaCl in der Kulturlösung erreicht, einer Konzentration, die *P. media* nicht überlebt (Erdei und Kuiper 1979).

Die spezifischen Reaktionen von Halophyten lassen sich nur erklären, wenn man ein anderes Transportverhalten als bei salztoleranten Arten auf dem Niveau des Plasmalemmas unterstellt. Für eine Reihe von Kulturpflanzen konnte gezeigt werden, daß eine membranboundene ATPase das Plasmalemma für den Ionentransport energetisiert (Sze 1984, 1985). Untersuchungen über entsprechende Enzyme an Halophyten wurden bisher nur in wenigen Fällen durchgeführt. Aus den Ergebnissen konnte bisher kein klares Bild über Art und Umfang der Ausstattung des Plasmalemmas von Halophyten mit Transport-ATPasen gezeichnet werden.

Diese Arbeit liefert mit der Untersuchung der biochemischen Eigenschaften plasmalemmagebundener ATPasen aus unterschiedlich salztoleranten *Plantago*-Arten einen Beitrag zum Verständnis der Transporteigenschaften von Halophytenwurzeln. Hierzu war es zunächst notwendig, saubere Membranen definierten Ursprungs zu isolieren. Die biochemische Charakterisierung erfolgte dann vergleichend zwischen den unterschiedlich salztoleranten Arten. In einem dritten Schritt wurde der Einfluß saliner Kulturbedingungen auf die biochemischen Eigenschaften plasmalemmagebundener ATPasen studiert. Schließlich erwies es sich als notwendig, diese Enzyme zu solubilisieren und teilweise aufzureinigen. An diesen Enzympräparationen wurden die abschließenden charakterisierenden Analysen durchgeführt. Unterschiedlich salztolerante Arten aus der Gattung *Plantago* wurden aus zwei Gründen als Versuchsobjekte gewählt. Zum einen werden die Ergebnisse bei einem Vergleich von Arten aus einer einzigen Gattung nicht durch die unterschiedliche genetische Ausstattung nicht miteinander verwandter Untersuchungsobjekte verzerrt. Zum anderen liegen für diese Arten bereits eine ganze Reihe von Meßdaten zu Aspekten des Ionentransportes aus den Arbeitsgruppen Kuiper und Prins (Rijksuniversiteit te Groningen) vor, die in die Diskussion der Ergebnisse einbezogen werden können.

2 H⁺-ATPasen und andere Transportenzyme bei höheren Pflanzen

Viele der bisher bekanntgewordenen experimentellen Ergebnisse zu dem Themenkomplex membrangebundener Transportsysteme wurden in Einzelarbeiten publiziert. Es erscheint daher notwendig, in einer kurzen Einführung den gegenwärtigen Kenntnisstand über diese Transportproteine in höheren Pflanzen und Pilzen unter besonderer Berücksichtigung der Halophyten darzustellen.

Energieabhängige Transportvorgänge sind die Voraussetzung für jede Art von Ionenaufnahme, -abgabe und -translokation gegen Konzentrationsgradienten. Schon 1973 gelang es Hill und Hill (1973a,b), den Zusammenhang zwischen Chloridabgabe und Chlorid-stimulierter ATPase-Aktivität in den Salzdrüsen von *Limonium vulgare* nachzuweisen. Weitere Beispiele für solche aktiven Transportprozesse sind die Akkumulation von Photosyntheseprodukten und Malat bei CAM-Pflanzen in der Zentralvakuole (Lüttge et al. 1984, Martinoia et al. 1985, Raven und Smith 1979, Thom und Komor 1984). Als treibende Kraft für die genannten Vorgänge gilt der cytoplasmatische ATP-Pool. Nach der Entdeckung einer tonoplastengebundenen ATPase und einer an derselben Membran lokalisierten Pyrophosphatase ließ sich ein Bild von den Transportvorgängen am Tonoplasten zeichnen, das die beobachteten Prozesse erklärt (Walker und Leigh 1981a,b). Diese beiden Enzyme arbeiten elektrogen und erzeugen einen elektrochemischen Gradienten über dem Tonoplasten, indem ein Protonentransport vom Cytoplasma in die Vakuole an die PP_i- bzw. ATP-Hydrolyse gekoppelt wird (Sze 1984). Dieser elektrochemische Gradient stellt die treibende Kraft für den Transport von Substanzen aus dem Cytoplasma in die Vakuole dar.

Ebenso wie der Transport von organischen Substanzen in die Vakuole erfolgt auch die Aufnahme von Kationen wie K⁺ aus dem umgebenden Medium in das Cytoplasma von Pflanzenzellen meist gegen hohe Konzentrationsgradienten (Leonard 1984,1985). Dieser Prozeß ist energieabhängig und konnte mit dem zellulären ATP-Gehalt korreliert werden (Petraglia und Poole 1980). Da auch in Präparationen von Plasmalemma eine vektorieLL arbeitende H⁺-ATPase nachgewiesen werden konnte, die unter ATP-Spaltung das Außenmedium ansäuert (Hodges 1976), läßt sich das in Abb.1 dargestellte Modell für den Transport von Ionen und organischen Stoffen zwischen

Außenmedium, Cytoplasma und Vakuole aufstellen (modifiziert nach Sze 1984). Hierbei wurden elektrophysiologische Daten von Rasi-Caldogno et al. (1985) und Churchill und Sze (1983) berücksichtigt.

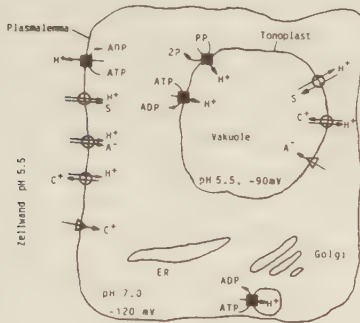


Abb.1: Modell der Transportsysteme in einer Pflanzenzelle, ohne Berücksichtigung von Mitochondrien, Chloroplasten, Kern und Mikrobodies (modifiziert nach Sze 1984).

■ Protonenpumpe ○ Sym- oder Antiport △ Ionenkanal

A⁻ = Anion, C⁺ = Kation, S = ungeladenes organ. Molekül

Durch die Kopplung von ATP- oder PP_i-Spaltung im Cytoplasma an den Transport von Protonen in Richtung Vakuole bzw. Zellwand wird ein elektrochemischer Gradient über Tonoplast und Plasmalemma aufgebaut. Der Energieinhalt eines derartigen Gradienten beträgt

$$\mu_H = \Delta \psi F + 59 \Delta pH \quad (\text{bei } 25^\circ \text{ C})$$

(mit μ_H = Freie Energie; $\Delta \psi$ = Membranpotentialdifferenz)

Im Falle der in Abb.1 eingezeichneten Potentialdifferenz von ca. 120 mV zwischen Cytoplasma und Zellwand würde beispielsweise eine K⁺-Konzentration von 100 mM im Cytoplasma mit 1 mM in der Zellwand im Gleichgewicht stehen. Noch größere Konzentrationsgradienten könnten unter Ausnutzung der pH-Komponente durch Kopplung des Protonenrückflusses an einen Kaliuminflux erzielt werden.

Kationen können vom umgebenden Medium entlang des elektrischen Gradienten durch Ionenkanäle in das Cytoplasma gelangen oder auch mit Antiportsystemen im Austausch gegen H^+ transportiert werden (Blumwald und Poole 1985, Schumaker und Sze 1985). Für die K^+ -Aufnahme über das Plasmalemma der Hefe *Neurospora crassa* fanden Rodriguez-Navarro et al. (1986) Hinweise auf einen K^+/H^+ -Symport, bei dem pro rückfließendem Proton ein Kaliumion mit aufgenommen wird. Die erste Arbeit an höheren Pflanzen auf diesem Gebiet wurde von Marre et al. (1987) publiziert. K^+ -Aufnahme in Blattzellen von *Elodea densa* ist an eine geringe, aber meßbare pH-Erhöhung im Cytoplasma gekoppelt. Dies wird von den Autoren als Hinweis darauf gedeutet, daß das Kation eine Depolarisation des Membranpotentials induziert. Weitere Ergebnisse liegen aus patch-clamp-Untersuchungen am Plasmalemma von Schließzellen höherer Pflanzen von Schröder vor (MPI Göttingen, Publikation in Vorbereitung). Er konnte zeigen, daß in diesen Membranen Kationenkanäle mit der Selektivitätsreihenfolge $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+$ existieren.

Der genaue Mechanismus des Kationentransportes von der Zellwand in das Cytoplasma ist noch nicht geklärt. Briskin (1986) wirft anhand von Daten von Leonard (1985) die Frage auf, ob für den Transport von K^+ möglicherweise eine direkte mechanistische Kopplung von K^+ -Influx mit H^+ -Efflux an einer plasmalemmagebundenen H^+ -ATPase verantwortlich ist. Eine solche Kopplung könne in Analogie zur tierischen Na/K-ATPase stehen. Parallelen zwischen pflanzlicher Plasmalemma-ATPase und tierischer Na^+/K^+ -ATPase wurden auch von anderen Autoren gezogen (Vakhmistrov et al. 1982, Wingstrand 1985). Das Enzym transportiert im Austausch Na^+ gegen K^+ (Cantley 1981). Sollte in Halophyten ein ähnliches Enzym mit gleicher Funktion vorhanden sein, so hätte dies natürlich erheblichen Einfluß auf die Regulation des Na^+ -Gehaltes von Cytoplasma und Xylemsaft.

Gerade für den im Zusammenhang mit Salztoleranz besonders wichtigen Transport von Na^+ über das Plasmalemma hinweg liegen z. Zt. überhaupt noch keine direkten experimentellen Daten vor. Indirekte Analysen wurden von DeBoer (1985) vorgenommen. Nach seinen Untersuchungen läßt sich an Xylemparenchymzellen in der Wurzel des Halophyten *Plantago maritima* gekoppelte Protonen- und K^+ -Abgabe in den Xylemsaft induzieren. Diese Reaktion kann sowohl

durch Salzbehandlung der Wurzeln als auch durch Fusicoccin, einen Stimulator der Plasmalemma-ATPase (Rasi-Caldogno und Pugliarello 1985), ausgelöst werden.

In den folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften der aus Pflanzen bekannten ATPasen und der Tonoplasten-Pyrophosphatase beschrieben. Hierdurch soll zum einen am Beispiel der relativ gut untersuchten F_0 - F_1 -ATPasen ein Eindruck davon vermittelt werden, wie ein gerichteter Ionentransport an ATP-Spaltung gekoppelt werden kann. Zum anderen ist es notwendig, sich kurz mit den Eigenschaften derjenigen Enzyme auseinanderzusetzen, die im Falle von verunreinigten Membran-Präparationen experimentelle Ergebnisse über die plasmalemma-gebundene ATPasen verfälschen würden.

2.1. Protonen-ATPasen vom F_0 - F_1 -Typ

In Mitochondrien, Chloroplasten, heterotrophen und photoautotrophen Bakterien tritt eine relativ einheitliche Gruppe von ATPasen auf, die nach dem sogenannten F_0 - F_1 -Schema aufgebaut sind (Amzel und Pedersen 1983). In allen Fällen ist die biologische Funktion dieser Enzymkomplexe darin zu sehen, daß unter Abbau eines von Elektronentransportketten erzeugten Protonengradienten ATP gebildet wird. Hierbei werden die dem Gradienten folgenden Protonen durch die F_0 -Einheit gelenkt und an die Bildung einer Anhydridbindung zwischen ADP und P_i gekoppelt (Mitchell 1966).

Abb.2 zeigt eine schematische Darstellung des F_0 - F_1 -Komplexes nach Amzel und Pedersen.

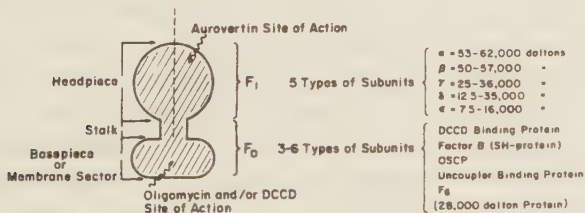


Abb.2: Modell der F_0 - F_1 -ATPase (Amzel und Pedersen 1983)

Der aus mehreren Untereinheiten bestehende Enzymkomplex weist drei größere strukturelle Einheiten auf. Der oligomycinbindende,

wasserunlösliche F_0 -Teil erstreckt sich durch die Membran und dirigiert Protonen zu F_1 hin oder davon weg. F_1 selbst ist wasserlöslich, sitzt der Membran auf und weist ATPase-Aktivität auch unabhängig von F_0 auf. Unter einer dritten, nicht eingezeichneten Komponente "I" wird eine regulatorische Einheit verstanden, deren Hauptaufgabe vermutlich darin besteht, die Hydrolyse von frisch gebildetem ATP zu verhindern.

Der ATPase-Komplex (F_1) besteht aus etwa 8-10 Untereinheiten, von denen es 5 verschiedene Typen mit unterschiedlichen Molekulargewichten gibt (α - ϵ). Die vermutliche Stöchiometrie wird von Amzel und Pedersen (1983) mit $\alpha_3\beta_3\gamma_1\epsilon$ mit einem Gesamt-molekulargewicht von 381 kD angegeben. Dieser Sektor bindet Adeninnukleotide und wird im Falle des mitochondrialen Enzyms durch Azid gehemmt.

Die F_0 -Einheit aus *Escherichia coli* enthält drei Untereinheiten, von denen eine DCCD an einem Aspartyl- oder Glutamylrest bindet. Eine andere Untereinheit weist eine hydrophile und eine hydrophobe Domäne auf und ist vermutlich für die Verankerung des F_1 -Anteils an der Membran verantwortlich. Die F_0 -Einheit enthält außerdem eine Bindungsstelle für den Inhibitor Oligomycin.

Der Mechanismus der ATP-Synthase-Reaktion wird ausführlich im Review von Wang (1983) diskutiert. Stereochemische Untersuchungen zeigten, daß die Hydrolyse von ATP unter Inversion der Konfiguration am endständigen Phosphoratom abläuft. Diese Reaktion erfolgt daher unter nukleophilem Angriff des Wasser-Sauerstoffatoms am endständigen Phosphat und nicht über eine phosphorylierte Zwischenstufe des Enzyms, wie es für die tierische Na/K-ATPase gezeigt werden konnte. Eine phosphorylierte Zwischenstufe würde nämlich wegen der zweimal stattfindenden Konfigurationsumkehr zur Wiederherstellung der Ausgangskonfiguration im Reaktionsprodukt führen. Umgekehrt zur Hydrolyse wird für die ATP-Bildung durch die F_0 - F_1 -ATPase ein nukleophiler Angriff von gebundenem P_i an das gebundene ADP angenommen. Für die Hydrolyse von ATP schlägt Wang (1983) unter Berücksichtigung der essentiell beteiligten Aminosäurereste den folgenden Mechanismus vor (Abb.3).

Lysin und Tyrosinreste übertragen direkt Protonen auf das γ -Phosphat des gebundenen ATP (s. Pfeile). Anschließend Protonen-transfer von gebundenem Wasser an das entstandene Phenolatanion

des Tyrosins und synchronisierter nukleophiler Angriff des entstehenden Hydroxids an den Phosphor ergeben eine trigonal-bipyramidale Zwischenstufe am endständigen Phosphat, die mit den stereochemischen Untersuchungen übereinstimmt. Anschließend kann sich das dreifach protonierte Phosphat und das unprotonierte ADP ablösen. Bei dem physiologischen pH von 7.0 bis 7.5 würde das Phosphat dann unter Protonenabgabe sofort in eine stabilere Form übergehen. Im Falle der intakten Membran ist es vorstellbar, daß die bei der Deprotonierung freiwerdenden Protonen nur unter Konformationsänderungen des Proteins abdissoziieren können und daß auf diese Weise ein Protonenfluß in Richtung F_o erzeugt wird.

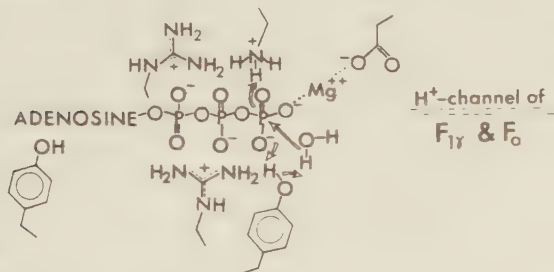


Abb.3: Vorschlag für den Mechanismus der ATP-Hydrolyse durch F_1F_0 -ATPasen (Wang 1983)

2.2. Andere pflanzliche membran gebundene Phosphatasen

In erster Linie ist hier die mittlerweile recht gut charakterisierte Tonoplasten- H^+ -ATPase zu nennen. Sie besteht wie die F_1F_0 -ATPase aus mehreren Untereinheiten und wird bei der ATPase-Reaktion nicht phosphoryliert. Sie ist spezifisch für $MgATP^{2-}$ mit einer Michaelis-Konstanten von 0.1 bis 0.2 mM, wird durch Chlorid stimuliert und durch Nitrat und DCCD gehemmt (Sze 1984). Ein weiteres wichtiges Transportenzym ist die Tonoplasten-Pyrophosphatase. Dieses Enzym transportiert unter PP_i -Spaltung Protonen aus dem Cytoplasma in die Vakuole und ergänzt so die Tonoplasten-ATPase. Weitere ATPasen und eine weitere Pyrophosphatase wurden in jüngster Zeit aus der inneren Chloroplastenhülle (McCarty et al. 1984), dem Endoplasmatischen Reticulum (Buckhout 1984) und Golgi-Vesikeln (Chanson et al. 1984, 1985, Ali und Akazawa 1986) beschrieben. Die Analyse der biochemischen Eigenschaften und der Funktion dieser Enzyme in der Zelle steht noch am Anfang.

2.3. Plasmalemma-ATPase

Die Eigenschaften dieser ATPase, die nach bisherigem Kenntnisstand für die Energetisierung des Plasmalemmas für den Transport von Ionen und ungeladenen Teilchen verantwortlich ist, wurden vor allem an Getreidearten und an verschiedenen Kulturformen von *Beta vulgaris* untersucht. Hierbei zeigte sich, daß das Enzym je nach untersuchter Art ein pH-Optimum von 5.5 bis 7.0 aufweist, eine Sättigungskinetik mit K_m bei 0.3 bis 0.5 mM MgATP zeigt, und durch Vanadat und DCCD gehemmt wird. Die ATPase wird durch monovalente Kationen stimuliert und reagiert nicht auf Anionen. Elektrophoretische Analysen hoch gereinigter Enzympräparationen wiesen je nach Art meist eine einzige Bande mit einem Molekulargewicht von 90 bis 105 kD auf (Serrano 1984a, Sze 1984, 1985). Dieses Polypeptid wird durch ATP an einer Aspartylgruppe phosphoryliert (Briskin und Poole 1983, Serrano 1984b, Vara und Serrano 1983). Durch radioaktive Inaktivierung des Enzyms und Dosis-Wirkung-Zielgrößen-Berechnung schlossen Briskin et al. (1985b) auf ein Molekulargewicht des aktiven Proteins *in vivo* von 228 kD. Unter Berücksichtigung des aus der Gelelektrophorese bestimmten Molekulargewichts der aktiven Untereinheit von ca. 100 kD nehmen die Autoren an, daß das Protein in der Membran als Dimer vorliegt. Dies steht im Einklang mit Bindungsstudien von Sussman und Slayman (1982). Diese Autoren konnten zeigen, daß ein DCCD-Molekül pro zwei ATPase-Moleküle für die vollständige Inaktivierung der ATPase-Aktivität in *Neurospora crassa* ausreicht.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die Plasmalemma-H⁺-ATPase keine Verwandtschaft mit den anderen bisher bekannten ATPasen aufweist. Selbst bei den bisher am besten untersuchten Objekten, d.h. der ATPase aus verschiedenen Getreidearten und *Beta vulgaris*, sind die vorliegenden Informationen über den Aufbau des Enzyms zu gering, um Aussagen über Struktur und Wirkungsweise machen zu können, wie dies bei den ATPasen vom F₀-F₁-Typ erfolgt ist.

2.4. Untersuchungen an Plasmamembran-ATPase in Zusammenhang mit Salztoleranz

Die ersten Arbeiten, die sich mit dem Zusammenhang zwischen membran gebundenen Transportproteinen und Salztoleranz befaßten, stammen aus der Arbeitsgruppe P. Kuiper (Universität Groningen). In mehreren Arbeiten analysierten Kuiper und Mitarbeiter die Eigenschaften membran gebundener ATPase-Aktivitäten an "crude microsomes" aus den Wurzeln salztoleranter und salzsensitiver *Plantago*-Arten (Erdei und Kuiper 1980, Erdei et al. 1980, Kuiper und Kuiper 1979a,b). In den untersuchten Präparationen waren Mg-ATPase- und CaATPase-Aktivität etwa gleich hoch. Die MgATPasen zeigten in den untersuchten Arten i.A. relativ breite pH-Optima von 6.0 - 7.0 sowie ein zweites Optimum bei pH 8.0 bei *Plantago major* und *P. maritima*. Die angegebenen K_m -Werte lagen bei etwa 0.8 bis 1.0 mM MgATP. Salzbehandlung der Versuchspflanzen hatte wenig Einfluß auf die K_m -Werte, führte aber zu einer leichten Erniedrigung der spezifischen Aktivität. Die MgATPase wurde durch Na^+ und K^+ stimuliert, und die kombinierte Gabe beider Kationen ergab komplexe kooperative Effekte. Diese Arbeitsgruppe fand auch eine positive Korrelation zwischen der ATPase-Aktivität und dem Gehalt der untersuchten Membranen an Sulfolipiden und schloß hieraus auf einen Einfluß von Sulfolipid-Protein-Wechselwirkungen auf die ATPase-Aktivität (Erdei et al. 1980).

Vakhmistrov et al. (1982) untersuchten Plasmamembran-Vesikel, die sie aus Sprossen des Halophyten *Halocnemum strobilaceum* durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen hatten. Die in diesen Präparationen gefundene ATPase-Aktivität zeigte deutliche kooperative Stimulation durch Na^+ und K^+ . Die zusätzliche Stimulation der ATPase durch die einwertigen Kationen war Ouabain-sensitiv. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren auf Ähnlichkeiten zwischen der Plasmamembran-ATPase des Halophyten und tierischer Na/K-ATPase. In diesem Enzym, das durch Na^+ und K^+ kooperativ stimuliert wird, ist die K^+ -Bindungsstelle durch Ouabain blockierbar (Buddecke 1984).

In Untersuchungen des Effektes monovalenter Kationen auf membran gebundene ATPase aus Wurzeln des unter nicht salinen Bedingungen angezogenen Halophyten *Atriplex nummularia* fanden Lerner et al. (1983) Unterschiede zu entsprechenden Präparationen aus *Pisum*

sativum. Während die an eine nicht weiter aufgearbeitete Membranfraktion ("crude microsomes") gebundene ATPase aus *A. nummularia* durch KCl und NaCl im Konzentrationsbereich bis 300 mM stimuliert wurde, reagierte das Enzym aus *P. sativum* mit Inhibition ab 50 mM. Eine stärker gereinigte Fraktion aus einem Saccharosegradienten zeigte bei *A. nummularia*, daß die KCl-Stimulation auf den pH-Bereich um 6.0 begrenzt ist. In einer späteren Arbeit (Braun et al. 1986) untersuchte diese Gruppe die Protonen translozierenden Eigenschaften dieser gradientengereinigten Membranen. Dabei zeigte sich, daß erst unter salinen Anzuchtbedingungen die gesamten biochemischen Eigenschaften der ATPase ausgebildet wurden (KCl-Stimulation, pH-Optimum, Sättigungskinetik). Da die Autoren in der ersten Arbeit über keine auffälligen Eigenschaften der ATPase-Aktivität berichten, erscheinen diese Befunde aus derselben Arbeitsgruppe an gleichem Membranmaterial widersprüchlich. Eine Diskussion der früher veröffentlichten Ergebnisse in der Arbeit von 1986 erfolgte nicht.

Comerford et al. (1985) analysierten membrangebundene ATPase aus der marinen Hefe *Debaryomyces hansenii*, die sie in Nährmedium mit und ohne 1.5 M NaCl angezogen hatten. Die Membranen wurden aus "crude microsomes" mit einer Zentrifugation durch ein Saccharosekissen gereinigt. Die Salzbehandlung der Hefen führte zu Änderungen der pH-Abhängigkeit der ATPase-Reaktion. Neben dem Auftreten eines zweiten Optimums bei pH 8.0 kam es zu einer Verfünffachung der spezifischen Aktivität bei dem in den Kontrollpflanzen beobachteten pH-Optimum bei pH 6.0.

Die Analysen der Plasmalemma-ATPase aus Kulturpflanzen hatten ein relativ einheitliches Bild ergeben (Serrano 1984a, Sze 1984, 1985). Demgegenüber deuteten die von Halophyten bzw. halophilen Hefen berichteten Ergebnisse auf zum Teil erhebliche Änderungen in den biochemischen Eigenschaften dieses Enzyms hin, wenn salztolerante und salzsensitive Arten oder salzbehandelte und unbehandelten Pflanzen miteinander verglichen wurden. Dabei können allerdings wegen der verwendeten Isolationsmethoden Kontaminationen durch andere Membransysteme in den als Plasmalemma angesprochenen Fraktionen nicht ausgeschlossen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenmaterial

3.1.1. Vorkommen der verwendeten Pflanzen am natürlichen Standort

Untersuchungsobjekte der vorliegenden Arbeit sind drei salztolerante und drei salzsensitive bzw. salzintolerante *Plantago*-Arten. Die verwendete Nomenklatur richtet sich nach Rothmaler (1987) bzw. Pignatti (1982). Die salztoleranten Arten stammen aus der *Plantago coronopus* Gruppe. Es sind die beiden an der Nordseeküste vorkommenden *P. coronopus* L. und *P. maritima* L. sowie die mediterrane Art *P. crassifolia* Forskal. Während *P. coronopus* sowohl in nährstoffarmen, trockenen Dünenvegetationen als auch in beweideten, nährstoffreichen höheren Salzwiesen auftritt, findet sich *P. maritima* nur im unteren Salzwiesenbereich und nicht in Dünenvegetationen (Kuiper und Kuiper 1979a,b). Beide Arten sind in der Lage, Salinitätsschwankungen zu tolerieren, die durch zeitweise Überflutung mit nachfolgender Austrocknung des Bodens oder durch Aussüßung in Folge von Regen entstehen. *P. coronopus* ist im Unterschied zu *P. maritima* sehr trockenresistent. Dies drückt sich auch im unterschiedlichen Habitus der beiden Arten aus. Während *P. maritima* unbehaarte, sukkulente Blätter ähnlich *Triglochin maritima* zeigt, weist *P. coronopus* an trockenen Standorten eine dichte Behaarung auf, die vermutlich als Transpirationsschutz wirkt (Blom 1976). Der Sukkulenzgrad dieser Art ist von der Salinität des Milieus abhängig und steigt mit zunehmendem Salzgehalt des Bodens (Kuiper und Kuiper 1979b).

P. crassifolia Forskal ähnelt in seinem Habitus *P. maritima* L. Die Art zeigt ausgeprägte Blattsukkulenz bei unbehaarten Blättern. Mit Blattlängen bis zu 15 cm (Pignatti 1982) bleibt sie kleiner als *P. maritima*. Nach Pignatti (1982) und Tutin (1976) tritt die Art in mediterranen Salzwiesen und anderen salinen Standorten des mediterranen Raumes auf.

Als salzintolerante oder salzsensitive Kontrollarten wurden die drei in Mitteleuropa verbreiteten Arten *P. lanceolata* L., *P. media* L. und *P. major* L. mit den Subspezies *major* L. und *pleiosperma*

Pilger untersucht. *P.lanceolata* ist eine typische Graslandart, die Mahdiesen oder schwach beweidete Flächen besiedelt. Ihr Nährstoffbedarf ist niedriger als der von *P.major* ssp. *major*, gleichzeitig zeigt sie im Gelände eine niedrigere Salztoleranz als diese Art. Im niedersächsischen Küstenbereich tritt sie auf der Landseite der Deiche noch häufig, auf der Seeseite nur noch vereinzelt auf. *P.major* ssp. *major* steigt auf der Seeseite noch bis zum Deichfuß herab, vereinzelt finden sich auch Individuen an von Spritzwasser beeinflussten Steinwällen (eigene Beobachtungen). Auch *P.major* ssp. *pleiosperma* tritt in den Niederlanden noch an schwach salzbeeinflussten Standorten auf (M.Bos, pers.Mitt.). Diese Unterart kommt im Gegensatz zu ssp. *major* auch in schlecht durchlüfteten Böden vor (Kuiper und Kuiper 1979a). *P.media* gilt als Besiedler Ca^{2+} -reicher, ansonsten nährstoffarmer Böden. In Wasserkultur ist diese Art absolut salzintolerant und kommt auch unter natürlichen Bedingungen wie *P.lanceolata* nicht auf NaCl-beeinflußten Böden vor (Sagar und Harper 1964).

3.1.2. Kultivierung der Versuchspflanzen

Alle untersuchten *Plantago*-Arten wurden aus Samen angezogen. Die Samen von *P.major* ssp. *major* und *P.lanceolata* wurden in Oldenburg im Freiland gesammelt, die von *P.maritima* in Harlesiel und die von *P.coronopus* auf Spiekeroog. Das Saatgut von *P.major* ssp. *pleiosperma* wurde freundlicherweise von M.Bos (Universität Groningen) zur Verfügung gestellt und kommt aus einer Salzwiese bei Kwade Hoek. Die Samen von *P.media* stammen von Pflanzen aus dem Botanischen Garten Oldenburg. Saatgut von *P. crassifolia* wurde aus dem Botanischen Garten von Pisa erhalten und über eine Generation im Botanischen Garten Oldenburg weitergezogen. Es wurden die Samen der Folgegeneration verwendet.

Die Aussaat erfolgte auf Sand im Gewächshaus. Bis zur Entwicklung des zweiten Folgeblattes wurden die Sämlinge mit einer 1 %igen Nährlösung gewässert. Anschließend wurden die Pflanzen 3 Monate in einer Wasserkultur weiter kultiviert. Die Nährlösung bestand aus einer 25 bzw. 50%igen modifizierten Bruch'schen Lösung (Janniesch 1979) und wurde wöchentlich gewechselt. Für Untersuchungen unter salinen Bedingungen wurde nach 12 Wochen alle zwei Tage NaCl in Schritten a 50 mM zugesetzt. Nach Erreichen der endgülti-

gen NaCl-Konzentrationen wurden die Pflanzen mindestens drei weitere Wochen unter diesen Bedingungen kultiviert. Wegen des langsamen Wachstums von *P. crassifolia* mußte die Vorkultur bei dieser Art über vier Monate durchgeführt werden.

Die Kulturen wurden im Gewächshaus bei 30 - 40 % Luftfeuchtigkeit, 20 - 25 °C, und einer Lichtperiode von 16 h durchgeführt. Die Belichtungsstärke betrug $14.7 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ (9000 lx), als Lichtquelle dienten PHILIPS IP 23 Natriumdampflampen.

3.2. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von Boehringer, FLUKA, MERCK, SERVA und SIGMA bezogen. Wo es bei speziellen Chemikalien oder Verbrauchsmaterialien aus Gründen der Reproduzierbarkeit der Experimente nötig ist, sind die jeweiligen Hersteller im Text angegeben. Für die Lösungen wurde bidestilliertes Wasser eingesetzt. Lediglich der Aufschlußpuffer wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt.

3.3. Isolation von Membranvesikeln

50 - 80 g Wurzeln oder 60 - 100 g Blätter (Frischgewicht) wurden in deionisiertem Wasser gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Das Frischmaterial salzbehandelter Pflanzen wurde nicht länger als 10-20 sec. gewaschen, um einen osmotischen Schock zu vermeiden. Alle weiteren Schritte wurden bei 4° C in vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde in 250 - 300 ml Homogenisationspuffer in einem BÜHLER-Homogenisator (Tübingen) für 45 sec. aufgeschlossen. Der Homogenisationspuffer enthielt 250 mM Saccharose (bzw. 400 mM bei salzbehandelten Pflanzen), 50 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 4 mM EDTA, 2 mM DTE, 0.2 mM PMSF und 1 % (w/v) POLYCLAR AT (SERVA) (modifiziert nach Poole et al. 1984 und Yoshida und Uemura 1984). Bei weiterer Aufarbeitung mit einem diskontinuierlichen Dichtegradienten (s.u.) wurde statt Saccharose Sorbitol eingesetzt. Das Homogenat wurde durch eine Lage MIRACLOTH filtriert und das Filtrat unverzüglich bei 10000 g (10000 rpm) im A B.24 Rotor der KONTRON Kühlzentrifuge (Modell H 401) zentrifugiert. Nach 10 min wurden Überstand und Pellet

durch Dekantieren getrennt und der Überstand erneut zentrifugiert (30000 g, 20000 rpm, 60 min). Das hierbei anfallende Pellet ("crude microsomes") wurde je nach Weiterverarbeitung im entsprechenden Puffer aufgenommen.

3.4. Dichtegradientenzentrifugation

Die diskontinuierliche Gradientenzentrifugation erfolgte nach Yoshida et al. (1986b). Das Pellet der 30000 g-Zentrifugation ("crude microsomes") wurde in 2 ml 250 mM Sorbitol, 10 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 1 mM DTE, 1 mM EDTA aufgenommen. In 15 ml Nitrocelluloseöhrchen wurde ein diskontinuierlicher Saccharosegradient mit drei Lagen von jeweils 4 ml 45, 35 und 23 % Saccharose in Suspensionspuffer hergestellt. Dieser wurde mit 2 ml der Suspension der "crude microsomes" überschichtet. Nach Zentrifugation (2 h, 80000 g in der Beckman L8 Ultrazentrifuge) wurden die an den Interphasen sichtbaren Membranen mit einer Pasteurpipette geerntet und biochemisch analysiert.

3.5. Wäßriges Zweiphasensystem nach Lundborg et al. (1981) und Yoshida et al. (1983)

Die von diesen Autoren beschriebene Isolationsmethode für sauberes Plasmalemma wurde für die untersuchten *Plantago*-Arten optimiert (s. Ergebnisteil, Tab.6). Das aus diesen Versuchen resultierende Standardverfahren wird im Folgenden beschrieben.

Aus je 5.6 % (w/v) Polyethylenglykol 4000 (FLUKA) und Dextran 500000 (SIGMA), 30 mM KCl, 5 mM K-phosphat, pH 6.8 und 250 mM Saccharose in aqua bidest. wurde durch Kühlung auf 4 °C ein wäßriges Zweiphasensystem hergestellt. Ober- und Unterphase dieses Systems wurden getrennt aufbewahrt. Die aus 50 - 80 g Wurzeln bzw. 60 - 100 g Blättern anfallenden "crude microsomes" wurden in 7 ml Oberphase suspendiert. Hierzu wurden 7 ml Unterphase gegeben. Nach kräftigem Schütteln erfolgte die Phasentrennung durch 5-minütige Zentrifugation in COREX-Gläsern in der KONTRON-Kühlzentrifuge bei 4000 rpm im A 8.24 Rotor. Die hierbei anfallende Oberphase wurde abgenommen und auf Eis gestellt, die Unterphase mit 3.5 ml frischer Oberphase erneut extrahiert. Die bei dieser Reextraktion anfallende Oberphase wurde mit der ersten

vereinigt und beide mit 3.5 ml frischer Unterphase extrahiert. Nach Phasentrennung wurde die Oberphase abgenommen und auf 45 ml mit 250 mM Saccharose, 5 mM TRIS-MES, pH 6.0, verdünnt. Die Plasmalemmavesikel wurden durch Zentrifugation (60 min, 30000 g) pelletiert und das resultierende Pellet in 1 ml 250 mM Saccharose, 5 mM TRIS-MES, pH 6.0 aufgenommen und tiefgefroren, oder direkt weiterverarbeitet. Wurden salzbehandelte Pflanzen untersucht, so enthielten alle Lösungen 400 mM statt 250 mM Saccharose.

3.6. Solubilisation von Membranproteinen

Membranproteine aus isolierten Plasmalemma-Vesikeln wurden modifiziert nach Anthon und Spanswick (1986) solubilisiert. Bis zur Aufarbeitung wurden im Regelfall Plasmalemma-Präparationen von 300 bis 500 g Pflanzenmaterial gepoolt. Zu den Suspensionen wurden 60 mg KBr / ml (0.5 M) und TRITON X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0.1 % (w/v) zugesetzt. Nach 20 min auf Eis wurden die Membranen durch Zentrifugation (30 min, 30000 g in COREX-Glas im A 8.24 Rotor) pelletiert. Der Überstand enthält locker adsorbierte Membranproteine und wird als KBr/TRITON-lösliche Fraktion bezeichnet. Das Pellet wurde in 1 ml 100 mM KCl, 25 mM MES/KOH, pH 7.0, 1 mM DTT und 30 % (v/v) aufgenommen. Tropfenweise wurden auf dem VORTEX-Schüttler je 100 µl einer Lösung von 10 % Octylglucosid (SIGMA) und 2 % Deoxycholat (SIGMA) zugesetzt. Nach 10 min auf Eis wurden die Membranen erneut pelletiert. Der hierbei anfallende Überstand wird als Octylglucosid/DOC-lösliche Fraktion bezeichnet. Das Pellet wurde in 1 ml 25 mM MES/KOH, pH 6.0, 1 mM DTT, 30 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Hierzu wurden unter Schütteln 100 µl L- α -Lysophosphatidylcholin (SIGMA) (100 mg/ml) zugesetzt. Nach 2 min bei 37 °C und 10 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung in der auf 15 °C eingestellten KONTRON-Zentrifuge zentrifugiert (30 min, 30000 g). Der anfallende Überstand, die Lysophosphatidylcholin-lösliche Fraktion, enthält intrinsische Membranproteine.

3.7. Enzymatische Analysen

Die Analyse der ATPase-Aktivität erfolgte modifiziert nach Somma-

rin et al. (1985). 500 μ l Reaktionsvolumen enthielten 250 mM Saccharose, je 1.8 mM MgCl_2 und TRIS-ATP, 40 mM TRIS-MES (pH 6.1, wenn nicht anders angegeben), 45 mM KCl (wenn nicht anders angegeben), 0.018 % TRITON X-100 (v/v) und 2 - 8 μ g Membranprotein. TRIS-ATP wurde aus dem Natriumsalz über einen Kationenaustauscher gewonnen, der mit TRIS beladen war (BIORAD AG50-X8). Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C und wurde durch die Zugabe von 3.5 ml 1.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ in 343 mM H_2SO_4 gestoppt. Nach 5 min wurde 1 ml 15.3 mM Ascorbinsäure und 2.2 mM SnCl_2 in 300 mM H_2SO_4 zugesetzt. Die Ansätze wurden geschüttelt und nach 30 min wurde die Absorption bei 680 nm bestimmt. Die Kontrollen enthielten dieselben Chemikalien, doch wurde das Enzym erst unmittelbar vor dem Reaktionsende zugesetzt. Die Analysen wurden mit drei Parallelen durchgeführt.

Für kinetische Analysen wurden ATP und MgCl_2 in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. Die tatsächlichen Konzentrationen des $(\text{MgATP})^{2-}$ -Komplexes wurden berechnet (s.3.8.).

Latente UDPase und latente IDPase wurden nach Chanson et al. (1984) aus der Differenz der Phosphataseaktivität mit und ohne 0.1 % Digitonin in einem Reaktionsansatz ohne TRITON X-100 ermittelt. Die Substratkonzentration betrug 1 mM.

Oxidoreduktasen wurden nach Hodges und Leonard (1972) bei Raumtemperatur bestimmt.

Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM K-phosphat, pH 7.5, 1.67 mM KCN, 0.03 mM Cytochrom c und 0.1 mM NADH bzw. NADPH für die Reduktasen. Die Absorptionsänderung bei 550 nm wurde registriert und aus der Anfangssteigung die Aktivität berechnet. Hierbei wurde ein Absorptionskoeffizienten von $18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrundegelegt. Die Bestimmung der Cyt c Oxidase erfolgte im selben Puffer in Gegenwart von 0.01 % Digitonin und 0.015 mM reduziertem Cytochrom c.

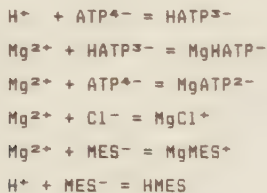
α -Mannosidase wurde nach Ali und Akazawa (1986) bestimmt. Die Reaktionslösung (0.5 ml) enthielt 10 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5.3, und 1 mM p-Nitrophenyl- α -mannopyranosid (SIGMA). Nach 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch die Addition von 0.8 ml 250 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 -Puffer (pH 10) gestoppt und die Absorption bei 400 nm bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde mit dem Absorptions-

koeffizienten von $9.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das p-Nitrophenylat-Anion berechnet.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) mit Serumalbumin als Standard.

3.8. Berechnung der aktuellen $(\text{MgATP})^{2-}$ -Konzentration

Die tatsächliche Konzentration des 1:1-Komplexes aus ATP^{4-} und Mg^{2+} in verdünnten wäßrigen Lösungen ist stark konzentrations- und pH-abhängig. Für die kinetischen Analysen erwies es sich daher als unbedingt notwendig, diese Konzentration für jeden Meßpunkt zu berechnen. Dabei wurde von folgenden Reaktionsgleichgewichten ausgegangen:



Für diese miteinander konkurrierend ablaufenden Reaktionen wurde mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes ein Gleichungssystem aufgestellt, das im Folgenden so gelöst wird, daß die Konzentration des MgATP^{2-} -Komplexes berechnet werden kann.

Es seien a, b, c, d, e, f und x die Konzentrationen von HATP^{3-} , ATP^{4-} , MgHATP^- , Mg^{2+} , MgCl^+ , MgMES^+ und MgATP^{2-} .

Dann gelten folgende Gleichungen:

$$\begin{aligned} \text{(I):} \quad a &= b \cdot (\text{H}^+) \cdot K_1 \\ \text{(II):} \quad c &= a \cdot d \cdot K_2 \\ \text{(III):} \quad x &= b \cdot d \cdot K_3 \\ \text{(IV):} \quad e &= d \cdot (\text{Cl}^-) \cdot K_{\text{Cl}} \\ \text{(V):} \quad f &= d \cdot (\text{MES}^-) \cdot K_{\text{MES}} \\ \text{(VI):} \quad \text{ATP}_{\text{tot}} &= a + b + c + x \\ \text{(VII):} \quad \text{Mg}_{\text{tot}} &= c + d + e + f + x \end{aligned} \quad \Leftrightarrow \quad b = \frac{x}{d \cdot K_3}$$

Die erste Vereinfachung ergibt sich, wenn man berücksichtigt, daß (Cl^-) und (MES^-) sehr viel größer als (Mg^{2+}) sind und damit in erster Näherung im betrachteten Konzentrationsbereich als

konstant angenommen werden können.

$$\rightarrow (IV) \Rightarrow e = \text{const}_1 * d \text{ und}$$

$$(V) \Rightarrow f = \text{const}_2 * d$$

$$+ (VIIa): Mg_{\text{tot}} = c + x + (1 + \text{const}_1 + \text{const}_2) * d$$

$$\text{und mit } (1 + \text{const}_1 + \text{const}_2) := g$$

$$\Rightarrow (VIIb): Mg_{\text{tot}} = c + x + g * d \Leftrightarrow d = \frac{Mg_{\text{tot}} - x - c}{g}$$

$$(I) \text{ und } (III): a = \frac{x * (H)^+ * K_1}{d * K_3} \quad (VIII)$$

$$\text{in (II): } c = \frac{x * (H)^+ * K_1 * d * K_2}{d * K_3}$$

$$\Leftrightarrow c = \frac{x * (H)^+ * K_1 * K_2}{K_3}$$

$$\text{und mit } \frac{(H)^+ * K_1 * K_2}{K_3} := K_4$$

$$\Rightarrow c = x * K_4 \quad (IX)$$

$$\text{in (VIIb): } d = \frac{Mg_{\text{tot}} - x * (1 + K_4)}{g}$$

$$\text{Wir definieren } (1 + K_4) := K_5$$

$$\Rightarrow d = \frac{Mg_{\text{tot}} - x * K_5}{g} \quad (X)$$

$$\text{in (III): } b = \frac{x * g}{K_3 (Mg_{\text{tot}} - x * K_5)} \quad (XI)$$

$$\text{und dies in (I):}$$

$$\text{in (I): } a = \frac{x * (H)^+ * K_1 * g}{K_3 (Mg_{\text{tot}} - x * K_5)} \quad (XII)$$

(IX), (XI), (XII) in (VI) liefert nach Umformung:

$$0 = -ATP_{\text{tot}} * K_3 * (Mg_{\text{tot}} - K_5 * x) + x * (H)^+ * K_1 * g + x * g + x * (K_4 + 1) * K_3 * (Mg_{\text{tot}} - K_5 * x)$$

$$\Leftrightarrow 0 = -K_3 * Mg_{\text{tot}} * ATP_{\text{tot}} + x * [K_3 * K_5 * (Mg_{\text{tot}} + ATP_{\text{tot}}) + (H)^+ * K_1 * g + g] - x^2 * (K_3 + K_5^2)$$

Diese Gleichung liegt nun in der Form einer quadratischen Gleichung ($0 = a*x^2 + b*x + c$) vor, die die allgemeine Lösung

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{(b^2 - 4ac)}}{2a}$$

hat.

Eine Testrechnung zeigt, daß die andere mathematisch mögliche Lösung für x

$$x = \frac{-b + \sqrt{(b^2 - 4ac)}}{2a}$$

physikalisch nicht sinnvoll ist.

Unter Berücksichtigung der Definitionen für K_4 und K_5 und des Dissoziationsgleichgewichtes für HMES sind hierin

$$\begin{aligned} a &= K_3 + 2 * K_1 * K_2 * (H)^+ + \frac{(K_1 * K_2 * (H)^+)^2}{K_3} \\ b &= -((K_3 + K_1 * K_2 * (H)^+) * (Mg_{tot} + ATP_{tot}) + K_1 * g * (H)^+ + g) \\ c &= K_3 * Mg_{tot} * ATP_{tot} \\ g &= 1 + K_{MgCl} * (Cl)^- + K_{MgMES} * (MES)_{tot} * \frac{K_a^{MES}}{(H)^+ * K_a^{MES}} \end{aligned}$$

Den Berechnungen wurden die folgenden Gleichgewichtskonstanten zugrundegelegt:

K_1 (HATP³⁻): $1.20 * 10^7 M^{-1}$ (Phillips et al. 1966)

K_2 (MgHATP⁻): $669 M^{-1}$ (ebda.)

K_3 (MgATP²⁻): $5.5 * 10^4 M^{-1}$ (ebda.)

K_{MgCl} (MgCl⁺): $3.4 M^{-1}$ (Blair 1970)

K_{HMES} (MgMES⁺): $10 M^{-1}$ (geschätzt nach Smith und Martell 1970)

K_a^{MES} : $7.08 * 10^{-7} M$ (Herstellerangabe, SERVA).

Die nach Phillips et al. (1966) berechneten Werte wurden mit den dort angegebenen Formeln und der van't Hoff'schen Reaktionsisobaren für die Temperatur und Ionenstärke des Testansatzes korrigiert.

3.9. Gaschromatographie

Zur Bestimmung von Kohlenhydraten und Polyolen wurden gaschromatographische Analysen von frischem Pflanzenmaterial nach Moog (1985) durchgeführt.

Je 1.0 g Frischmaterial wurden im Mörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert, mit 10 ml 10 % EtOH, 0.1 % HCOOH extrahiert und in COREX-Gläser überführt. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (15 min, 30000 g) und 7 ml des Überstandes nacheinander

über eine Kationen- und eine Anionenaustauschersäule gegeben (BIO-RAD, AG 50-X8, H^+ -Form und AG 1-X8, Formiat-Form). Anschließend wurden die Säulen mit 50 ml H_2O nachgewaschen. Das Eluat wurde unter Vakuum bei 50 °C im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 ml H_2O gelöst und erneut bis zur Trockne eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde in 300 µl Pyridin / Ethylacetat (1:1) aufgenommen, mit 200 µl MSTFA versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur silyliert.

Die gaschromatographische Trennung der Zucker und Polyole erfolgte mit einem Shimadzu GC-9A mit FID auf einer 25 m Fused Silica Kapillarsäule, 0.25 mm i.D., die mit OV-101 belegt war (Macherey und Nagel, Düren). Dabei wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt. Die Initialtemperatur betrug 120 °C, die Initialzeit 2 min, die Aufheizrate 10 grd / min und die Endtemperatur 250 °C. Die qualitative Identifikation erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen und im Falle des Sorbitolnachweises durch GC-MS in einem Finnigan-MAT-212-Massenspektrometer. Die Peakflächen wurden für die quantitative Auswertung automatisch durch den an den Gaschromatographen angeschlossenen Chromatopac CR 3a (Shimadzu) ausgewertet.

3.10. Atomabsorptionsspektrometrie

Die Bestimmung von Na^+ und K^+ erfolgte mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie. Hierzu wurden die getrockneten Pflanzenproben in einer Kugelmühle zermahlen und anschließend in konz. HNO_3 in DURAN-Gläsern in einem LIEBISCH-Heizblock aufgeschlossen (Temperaturprogramm: je 30 min bei 90, 120 und 150 °C). Die quantitative Bestimmung erfolgte in der verdünnten Aufschlußlösung in Emission an einem VARIAN-AA-1275.

3.11. Chloridbestimmung

Chlorid wurde an getrockneten und gemahlenen Pflanzenproben folgendermaßen bestimmt. Zu je 100 mg Trockensubstanz wurden 10 ml 1 N H_2SO_4 zugesetzt. Die Suspension wurde im Heizblock 2 h bei 90 °C gehalten. Durch Zusatz von 0.5 N $Ba(OH)_2$ wurde das Sulfat gefällt und die Lösung unter Kontrolle durch eine pH-Elektrode auf pH 7 eingestellt. Die Suspension wurde auf 50 ml aufgefüllt,

durch ein Weißbandfilter filtriert (S&S) und im Eluat Chlorid mit einer Chlorid-sensitiven Elektrode (INGOLD) bestimmt.

3.12. Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Analyse der Membranproteine wurde entweder in 1.5 mm dicken Vertikalgelen oder in horizontalen ultradünnen Gelen durchgeführt. Es wurde jeweils ein 4 % Sammel- und ein 7 % Trenngel verwendet. Die AcrylamidstammLösung enthielt 28.8 g Acrylamid (SERVA) und 1.2 g Bisacrylamid (SERVA) auf 100 ml. Der Gelpuffer enthielt 375 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 0.1 % SDS und 20 % Glycerin (Endkonzentrationen). Die ultradünnen Gele wurden in der LKB-Gießapparatur auf SERVA-Fertigfolien gegossen. Die Elektrophorese erfolgte entweder in der LKB-Vertikalkammer oder auf dem LKB-Horizontal-Elektrophorese-Tisch nach den Herstellervorschriften (Görg et al. 1983) bei 500 V, 50 mA, 30 W für 3 Stunden bei 10 °C. Der Elektrodenpuffer enthielt 375 mM TRIS-Glycin, pH 8.3, 0.1 % SDS. Die Stromversorgung erfolgte mit dem LKB Power Supply (Nr. 2197). Vor dem Probenauftrag wurde eine Vorelektrophorese durchgeführt (20 min unter den beschriebenen Bedingungen).

Proteinproben (ca. 5 - 10 µg Protein) wurden 1:1 mit 0.15 M TRIS-HCl, pH 8.8, 1 % SDS, 50 % Glycerin versetzt und 15 min bei 37 °C gehalten. Unlösliche Bestandteile wurden in der Eppendorf-Microfuge abzentrifugiert, bevor die so vorbehandelten Proben auf das Gel aufgetragen wurden. Als Molekulargewichts-Marker wurde der SIGMA-SDS 200-Kit eingesetzt, der Markerproteine der Molekulargewichte 205, 116, 97.4, 66, 45 und 29 kD enthält.

Die Färbung der Gele erfolgte modifiziert nach Görg et al. (1983): Nach der Elektrophorese wurden die Gele unverzüglich für 20 min in 20 %iger Trichloressigsäure fixiert. Die TCA- und SDS-Reste wurden dann durch drei Waschschrirte a 10 min in Entfärber (10 % Essigsäure, 35 % Methanol) ausgewaschen. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung der Proteine (30 min in 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10 % Essigsäure, 50 % Methanol). Die Gele wurden dann durch mehrere Schritte in Entfärber bis zur Farblosigkeit des Hintergrundes gewaschen. Dies geschah meistens über Nacht. Essigsäure und Methanol wurden anschließend durch zweimaliges Waschen (je 10 min) in 10 % Ethanol, dann

dreimal 10 min in H_2O entfernt. Es folgte eine Silberfärbung (30 min in 0.1 % $AgNO_3$). Außen anhaftendes Silbernitrat wurde durch kurzes Waschen (10 - 20 sec. in H_2O) entfernt und das Gel in 3 % Na_2CO_3 , 0.02 % Formaldehyd entwickelt (15 min). Die Reaktion wurde durch 1 % ige Essigsäure gestoppt. Falls notwendig, erfolgte noch ein Recyclingschritt: das Silber wurde mit 1 % $K_3(Fe(CN)_6)$, 1.67 % $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$ ausgewaschen (5 min). Das Gel wurde dann bis zur Farblosigkeit mit H_2O gewaschen und die Silberfärbung wiederholt. Hierdurch konnte in vielen Fällen eine kontrastreichere Färbung erzielt werden als durch eine einfache Silberfärbung. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem ILFORD FP 4 Film unter Verwendung eines HOYA HMC Y (K2) Gelbfilters in Durchlicht photographiert.

4. Isolation von Plasmalemma aus differenziertem Gewebe von *Plantago*-Arten

In diesem Kapitel wird die Ausarbeitung der Isolationsmethode für sauberes Plasmalemma aus ausdifferenziertem Gewebe verschiedener *Plantago*-Arten beschrieben. Das für die Wahl der verwendeten Methode entscheidende Kriterium ist in erster Linie die Reinheit der isolierten Membranen, charakterisiert durch Markerenzyme, Inhibitorsensitivität und Substratspezifität der in den Membranen enthaltenen ATPase-Aktivität. Als weiteres Kriterium wird der technische und der zeitliche Aufwand für die Schritte von den "crude microsomes" bis zum sauberen Plasmalemma berücksichtigt.

Zur Analyse von Plasmalemma-ATPasen sind für Kulturpflanzen in der Literatur zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze beschrieben worden. Bei geeignetem Pflanzenmaterial ist es möglich, dieses Enzym direkt aus "crude microsomes" zu solubilisieren und es anschließend zu analysieren. Dieses Verfahren wurde erfolgreich von Anthon und Spanswick (1986) an sehr jungen Tomatenwurzeln angewandt. Der zweite Ansatz beruht darauf, daß in einem ersten Schritt zunächst einmal das Plasmalemma physikalisch von den anderen beim Aufschluß anfallenden Membransystemen getrennt wird. Die membrangebundenen Enzyme werden dann in gereinigtem Plasmalemma untersucht.

In dieser Arbeit wurde aus zwei Gründen der zweite Ansatz verfolgt. Erstens erschien es nicht sinnvoll, die Untersuchungen von vorneherein auf die Charakterisierung eines bestimmten Enzyms, nämlich der H^+ -ATPase zu beschränken. Würden die "crude microsomes" aus den salztoleranten Arten andere Transport-ATPasen, z.B. Na/K-ATPasen enthalten, so könnten diese bei einer auf die H^+ -ATPasen ausgerichteten Isolationsmethode leicht übersehen werden. Zweitens handelt es sich bei dem zu untersuchenden Material um voll ausdifferenziertes, zum Teil älteres Gewebe. Für solche Ausgangsmaterialien waren aus der Literatur noch keine gelungenen Ansätze zur Direktisolation der Plasmalemma-ATPase aus "crude microsomes" bekannt.

4.1. Charakterisierung von löslicher Phosphataseaktivität

Da als Ausgangsmaterial ausdifferenziertes Gewebe verwendet wurde, mußte davon ausgegangen werden, daß bei den Aufschlüssen ein erheblicher Teil vakuolärer Hydrolasen freigesetzt wird. Hierunter fällt auch eine unspezifische Phosphatase, die nach Bollner und Kende (1979) 86 % der gesamten in der Zelle vorhandenen Phosphataseaktivität ausmachen kann. Aus der Arbeit von Kaiser et al. (1986) ist bekannt, daß dieses Enzym bei Aufschlüssen sehr leicht an Membranen assoziiert und Aussagen über membrangebundene ATPasen verfälscht. Bevor Untersuchungen über die günstigste Aufreinigungsmethode für Plasmalemma durchgeführt wurden, erschien es daher notwendig, zunächst einmal die Eigenschaften dieser Phosphatase in den untersuchten Arten zu studieren, um sie gegebenenfalls in Membranpräparationen als Kontamination identifizieren zu können.

Die biochemischen Eigenschaften der im Überstand der 30000 g-Zentrifugation auftretenden löslichen Phosphatase-Aktivität aus Blättern des Halophyten *Plantago maritima* und des Glykophyten *P. lanceolata* sind in den folgenden Abbildungen und Tabellen dargestellt. Abb. 4 zeigt das pH-Profil, Abb.5 die Substratabhängigkeit der Enzyme.

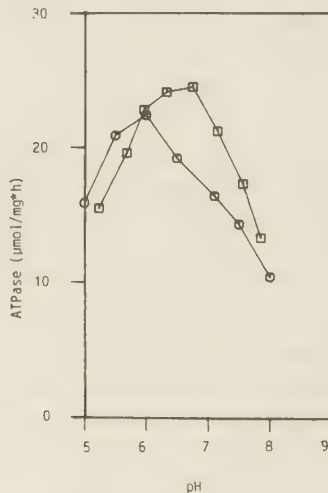


Abb.4: pH-Abhängigkeit der ATP-Spaltung durch lösliche Phosphatase aus Blättern von (□) *Plantago lanceolata* und (○) *P. maritima*

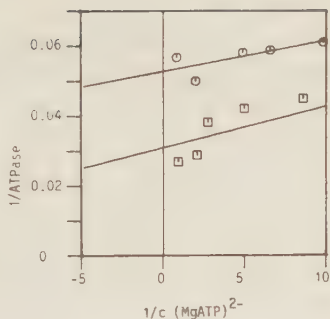
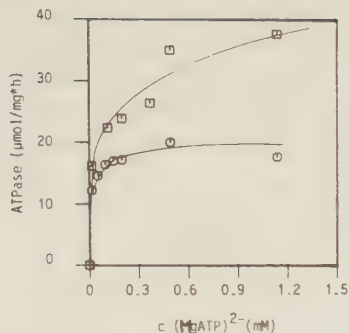


Abb. 5: Substratabhängigkeit der ATP-Spaltung durch lösliche Phosphatase aus Blättern von (□) *P. lanceolata* und (○) *P. maritima*. Links: Originaldaten, Rechts: Lineweaver-Burk-Plot

Die lösliche Phosphataseaktivität aus *Plantago maritima* zeigt ein pH-Optimum im sauren Bereich bei pH 6 und eine Sättigungskinetik mit einer K_m von 0.02 mM MgATP^{2-} . Die aus *P. lanceolata* erhaltene Aktivität weist ein neutrales pH-Optimum bei pH 7 und eine höhere K_m von 0.04 mM MgATP^{2-} auf. Die pH-Optima fallen damit in den Bereich, der für die Plasmalemma-ATPase der bisher untersuchten Kulturpflanzen publiziert wurde (Sze 1985). Ein wesentlicher Unterschied zu diesem Enzym findet sich aber in den um eine Zehnerpotenz niedrigeren K_m -Werten. Sze gibt in ihren Reviews (1984, 1985) für die Plasmalemma-ATPase Michaelis-Konstanten von 0.3 bis 0.5 mM MgATP^{2-} an.

Zwei wichtige Kriterien für die Anwesenheit von vakuolärer Phosphatase in Membranpräparationen sind die Hydrolyse des synthetischen Substrats PNPP und die Molybdathemmbarkeit des Enzyms (Gallagher und Leonard 1982, Kaiser et al. 1986). Am Beispiel einer Präparation aus *Plantago lanceolata* wurden diese Eigenschaften untersucht. Die Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von verschiedenen Molybdat-Konzentrationen im Testansatz ist in Abb. 6 gezeigt.

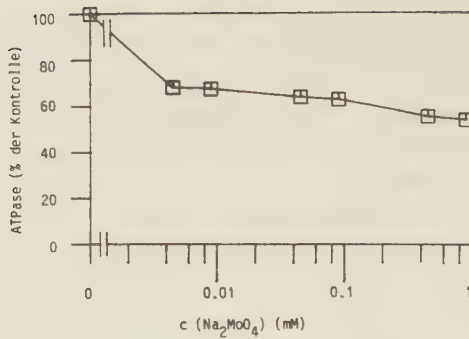


Abb. 6: Hemmung der ATP-Hydrolyse durch lösliche Phosphatase aus Blättern von *P. lanceolata* mit Na_2MoO_4 .

Die Phosphatase-Aktivität wird zwar deutlich durch Molybdat gehemmt, zeigt aber selbst bei 1 mM Na_2MoO_4 im Testansatz noch eine Aktivität von ca. 60 % der Kontrolle ohne Inhibitor.

Zur weiteren Charakterisierung der löslichen Phosphatase wurde ihre Substratspezifität mit einer Reihe von Nukleotiden, PNPP und anorganischem Pyrophosphat untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1: Substratabhängigkeit der löslichen Phosphatase aus dem 30000 g-Überstand aus Blättern von *Plantago lanceolata*

Substrat (je 0.9 mM)	freigesetztes P_i / $\mu\text{g s}^{-1}\text{h}$
ATP	27.0
ADP	122.0
AMP	2.2
GTP	39.7
CTP	37.9
UTP	34.5
ITP	41.5
PP_i	12.3
PNPP	6.0

Die Phosphatase bevorzugt andere Trinukleotide gegenüber ATP als Substrat, zeigt aber eine noch größere Präferenz für ADP. Dieses liefert eine etwa fünfmal so hohe Aktivität wie ATP. Die Aktivität mit PNPP ist dagegen deutlich niedriger als mit den Nukleotiden, dasselbe gilt für Pyrophosphat.

Ein Vergleich der hier gezeigten Ergebnisse mit Literaturdaten zeigt deutliche Abweichungen in den biochemischen Eigenschaften der löslichen Phosphataseaktivität aus den Blättern von *Plantago maritima* und *P. lanceolata* zu der Enzymaktivität aus den bisher untersuchten Arten. Smith et al. (1984) geben für *Kalanchoe daigremontiana* ein pH-Optimum bei pH 5.5 an. Bei Gallagher und Leonard (1982) finden sich ebenfalls Angaben über die pH-Abhängigkeit des Enzyms aus *Avena sativa* mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei pH 5.5. Diese Autoren berichten auch von einer ca. 90 %igen Hemmbarkeit der Aktivität durch 100 μ M Molybdat. Der Hemmeffekt ist also in der Präparation aus *P. lanceolata* deutlich niedriger und damit eher vergleichbar mit der Enzymaktivität aus *Zea mays* (Gallagher und Leonard 1982). Die lösliche Phosphatase aus dieser Art wurde durch 1 mM Molybdat zu etwa 65 % gehemmt. Über die kinetischen Eigenschaften der Enzymaktivität liegen keine Literaturdaten vor.

Es bleibt festzuhalten, daß die biochemischen Eigenschaften der löslichen Phosphatase aus *P. maritima* und *P. lanceolata* untereinander verschieden sind. Bei den untersuchten Aktivitäten muß es sich daher nicht um ein einziges Enzym handeln. Es ist wahrscheinlicher, daß eine Mischaktivität verschiedener Enzyme gemessen wurde, die Phosphorsäureanhydride hydrolysieren können.

Als Kriterium für Verunreinigung von Membranen mit löslicher Phosphataseaktivität wird nach den hier gezeigten Ergebnissen für *Plantago* im wesentlichen die ADPase-Aktivität und die Michaelis-Konstante für MgATP^{2-} herangezogen werden. Phosphataseaktivität mit PNPP und Molybdatheimmbarkeit können in den untersuchten Arten offenbar nur mit Einschränkung als Marker für eine Kontamination betrachtet werden.

4.2. Isolation von Plasmalemma aus *Plantago*-Arten

Zur Isolation von Biomembranen definierter Herkunft kann man sich verschiedener Verfahren bedienen. Handelt es sich beispielsweise um organellgebundene Membranen, wie Thylakoide oder Tonoplasten, ist es sinnvoll, zunächst das Organell selber aufzureinigen und von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen. In anderen Fällen (Plasmalemma, Golgi, ER) kann man physikalische Eigenschaften

zur Trennung nutzen, in denen sich die Membranen voneinander unterscheiden. Mit den verschiedenen Funktionen, die sie in der Zelle wahrnehmen, sind nämlich auch verschiedene biochemische Zusammensetzungen verbunden. Das Protein/Lipid Verhältnis oder die unterschiedlichen Anteile verschiedener Lipidklassen am Aufbau der Membranen haben entscheidenden Einfluß auf Parameter wie Dichte, Hydrophilie oder Ladung der Membranen und bieten damit Ansatzpunkte für die Entwicklung von Trennverfahren. In dieser Arbeit wurde mit zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden versucht, sauberes Plasmalemma aus *Plantago*-Arten zu isolieren. Es handelt sich dabei um die Dichtegradientenzentrifugation und die Trennung von Membranen in einem wäßrigen Zweiphasensystem, das von zwei wasserlöslichen Polymeren aufgebaut wird.

4.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Nach Sze (1984,1985) weist das Plasmalemma höherer Pflanzen in Saccharoselösungen eine Dichte von ca. 1.17 g/cm^3 auf und sollte daher prinzipiell durch Zentrifugation in entsprechenden Dichtegradienten von Membransystemen anderer Dichte (z.B. Tonoplast, ER oder Golgi) trennbar sein.

Zur Trennung der verschiedenen Membranen voneinander wurden die "crude microsomes" aus Blättern von *Plantago maritima* einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Das Ergebnis einer solchen Zentrifugation ist in Abb.7 und 8 dargestellt.

In dem von unten beleuchteten Zentrifugationsglas der Abb.7 treten als Pellet Thylakoide auf. An den drei Grenzschichten zwischen der Sorbitol- und den unterschiedlich dichten Saccharosephasen kann man Membranschichten erkennen, die durch den Tyndall-Effekt weiß leuchten (s.Pfeile). Diese drei Membranfraktionen werden von oben nach unten mit Fraktion I, II und III bezeichnet und den Phasengrenzen zwischen Sorbitol, 23, 35 und 45 % Saccharoselösung zugeordnet. Sie wurden getrennt mit einer Pasteurpipette geerntet und biochemisch charakterisiert.

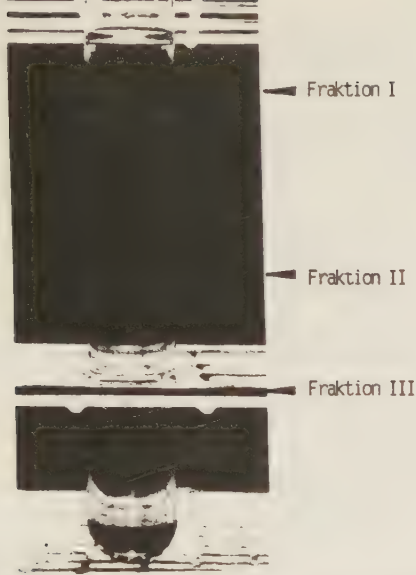


Abb.7: Verteilung von Membranen aus Blättern von *P.maritima* in einem diskontinuierlichen Sorbitol/Saccharose-Dichtegradienten

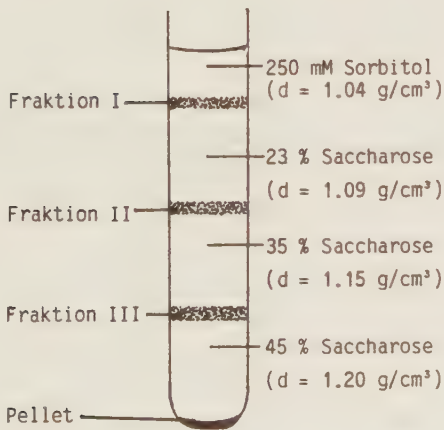


Abb.8: Schematische Darstellung der Verteilung von Membranen im diskontinuierlichen Dichtegradienten

4.2.1.1. Verteilung von Markerenzymen im Dichtegradienten

Zunächst wurde die Verteilung einer Reihe von Markerenzymen für verschiedene Membranen auf die drei Fraktionen untersucht (Tab.2). Dabei zeigte sich, daß Fraktion I zwei hydrolytische Enzyme enthält, die vermutlich aus der Vakuole stammen (Boller und Kende 1979), die unspezifische Phosphatase und die α -Mannosidase. Während die Phosphatase im Verlauf des Aufschlußverfahrens offenbar mit allen auftretenden Membransystemen assoziieren kann, ist die α -Mannosidase vorwiegend an Tonoplasten gebunden.

Tabelle 2: Verteilung von Markerenzymen auf die Membranen aus Interphasen des diskontinuierlichen Sorbitol/Saccharosegradienten. Mikrosomen aus Blättern von *P.sarritosa* wurden eingesetzt

Markerenzym	spezifisch für	Aktivitäten in Fraktion		
		I	II	III
ATPase (pH 6)	Plasmalemma ^a	97.1	38.8	36.6
ATPase-Hemmung durch 45 μ M Vanadat in %	Plasmalemma ^a	19	45	31
ATPase-Hemmung durch 45 mM Nitrat in %	Tonoplast ^a	0	0	0
α -Mannosidase	Tonoplast ^c	9.04	0.68	0.34
NADH-Cyt.c Reduktase	Tonoplast ^d	0.25	0.73	0.04
latente UDPase	Golgi ^a	16.4	14.0	6.0
latente IDPase	Golgi ^a	11.3	11.4	5.2
Cyt.c Oxidase	Mitochondrien ^a	0.0	0.027	0.024
NADPH-Cyt.c Reduktase	Endoplasmat.Ret. ^a	0.09	0.0	0.05
PNPPase	Unspezifische Phosphatase ^a	50.2	n.b.	15.8
Protein (%)		14	18	68

Phosphatase und α -Mannosidase-Aktivitäten sind in μ mol/mg.h, Oxidoreduktasen in μ mol/mg.min angegeben. n.b. = nicht bestimmt.

a: Gallagher und Leonard, 1982; b: Sze, 1984; c: Ali und Akazawa, 1986;

d: Hodges und Leonard, 1972; e: Chanson et al., 1984

In keiner der drei Fraktionen konnte nitratsensitive ATPase festgestellt werden, obwohl dieses Enzym bisher allgemein als Tonoplastenmarker galt (Sze 1985) und diese Membranen von ihrer

Dichte her in Fraktion I zu erwarten sind. Die auch als Tonoplastenmarker diskutierte NADH-abhängige Cytochrom-c-Reduktase (Hodges und Leonard 1972) zeigt Aktivität in den Fraktionen I und II. Die höchste Vanadat-Hemmbarkeit der ATPase-Aktivität (Marker für Plasmalemma) findet sich in den Fraktionen II und III.

Das Auftreten von unspezifischer Phosphatase in Fraktion I konnte durch Untersuchung der Kinetik der ATP-Hydrolyse belegt werden (Abb.9). Die ATPase-Aktivität zeigte eine Michaelis-Konstante von $0.02 \text{ mM MgATP}^{2-}$.

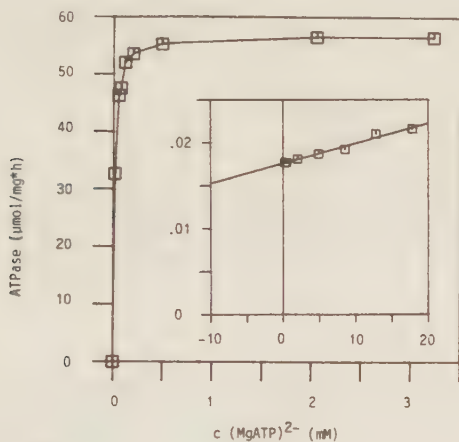


Abb.9: Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Aktivität in Mikrosomen aus Fraktion I. Untersuchungsmaterial waren Blätter von *P.maritima*. Kleine Abbildung: Lineweaver-Burk-Plot.

4.2.1.2. ATPase-Hemmung durch Inhibitoren und pH-Profile der ATPase in den Fraktionen aus dem Dichtegradienten

Ein weiteres Kriterium für die Verteilung verschiedener Membransysteme auf die Fraktionen ist die schon angesprochene Hemmung von ATPase-Aktivität durch verschiedene spezifische Inhibitoren. Das Ergebnis einer entsprechenden Analyse an Fraktion I findet sich in Tab.3.

Von allen untersuchten Inhibitoren erwies sich nur Vanadat als wirkungsvoll. Dieser Hemmstoff wirkt nach Literaturdaten nur auf

die an Plasmalemma und die innere Chloroplastenhülle gebundene ATPase. Von der fehlenden DCCD- und Molybdat-Sensitivität der ATPase in dieser Fraktion her scheiden aber beide Membranen als Ursache für die ATPase-Aktivität aus. Obwohl in dieser Fraktion von der Dichte her Tonoplasten zu erwarten sind, hat Nitrat keinen Effekt auf die ATPase-Aktivität. Dies konnte für den gesamten untersuchten pH-Bereich gezeigt werden (Abb.10).

Tabelle 3: Hemmung der ATPase-Aktivität bei pH 6.0 in Membranen aus Fraktion I des diskontinuierlichen Gradienten. Mikrosomen aus Blättern von *Plantago lanceolata* wurden eingesetzt.

Inhibitor	spezifisch für	ATPase ($\mu\text{mol/sgph}$)
ohne	—	97.1
Na_2VO_4 (1 mM)	Plasmalemma ^a , Chloroplastenhülle ^b	46.4
Na_2MoO_4 (1 mM)	Saure Phosphatase ^a , Chloroplastenhülle ^b	95.0
DCCD (100 μM)	Plasmalemma ^a , Tonoplast ^c	97.8
NaN_3 (1 mM)	Mitochondrien ^a	96.2
KNO_3 (45 mM)	Tonoplast ^c	96.4

a: Gallagher und Leonard, 1982; b: McCarty et al., 1984; c: Sze, 1985

Die pH-Abhängigkeit der ATPase zeigt in Fraktion I ein breites Optimum bei pH 6 - 7. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der ATPase aus Fraktion II und III in Gegenwart und Abwesenheit des Inhibitors Vanadat führte zu den in Abb.11 dargestellten Kurven.

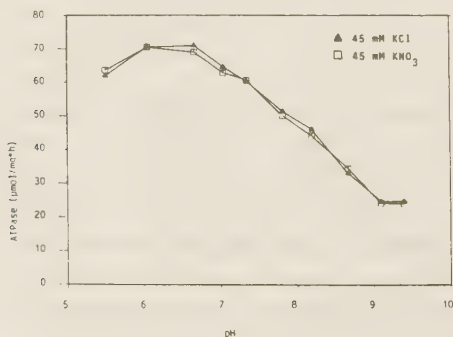


Abb.10: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in Mikrosomen aus Fraktion I des diskontinuierlichen Dichtegradienten. Es wurden Blätter von *P.maritima* eingesetzt. Der Testansatz enthielt 1 mM NaN_3 und 50 μM Na_2MoO_4 .

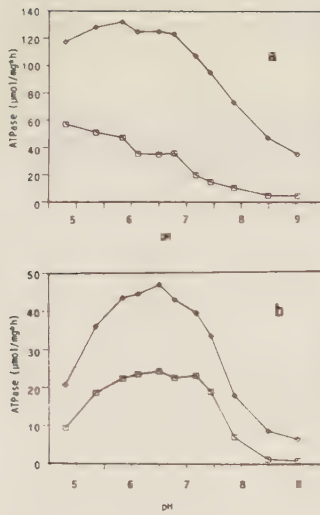


Abb.11: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Vanadat in Mikrosomen aus einem diskontinuierlichen Dichtegradienten mit Membranen aus Blättern von *P. maritima*. a: Fraktion I; b: Fraktion III. (◇): ATPase, (□): Inhibition der ATPase durch 50 µM Na_2VO_4 im Testansatz.

Während die Vanadat-Hemmung der ATPase in Fraktion II kein Optimum im untersuchten Bereich aufweist, zeigt Fraktion III ein deutliches Maximum bei pH 6 – 7. Die Konzentrationsabhängigkeit des Vanadat-Effektes sowie des Einflusses des Tonoplasten- und Plasmalemma-ATPase-Inhibitors DCCD auf die ATPase in Fraktion I und III ist in Abb.12 dargestellt.

Im Unterschied zu Fraktion I, in der nur Vanadat hemmend wirkt und bei etwa 1 mM zu einer 50 %igen Inhibition führt, zeigt Fraktion III deutliche Sensitivität gegenüber beiden Hemmstoffen. Hier wurde 50 %ige Hemmung bei jeweils 500 µM Inhibitorkonzentration festgestellt. Dieser Wert liegt etwa um den Faktor 10 über den Konzentrationen, die für Plasmalemma-ATPase aus einer Reihe von Kulturpflanzen berichtet wurden (Gallagher und Leonard 1982).

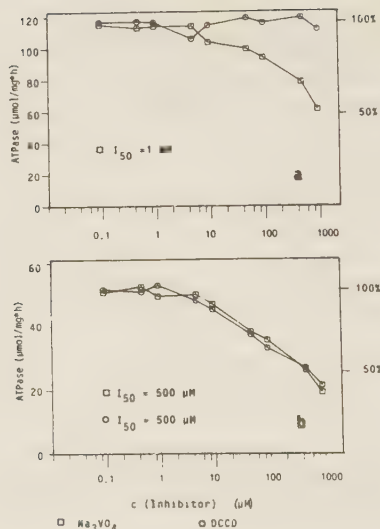


Abb.12: Einfluß von Na_3VO_4 und DCCD auf die ATPase-Aktivität in Mikrosomen aus a: Fraktion I und b: Fraktion III eines diskontinuierlichen Dichtegradienten mit Mikrosomen aus Blätter von *P.maritima*.

4.2.1.3. Substratspezifität der Phosphatase in den Fraktionen aus dem Dichtegradienten

Die Untersuchung der Substratspezifität sollte Aufschluß darüber geben, inwieweit die bei der Dichtegradientenzentrifugation anfallenden Fraktionen unspezifische Phosphataseaktivität enthalten. In Tab.4 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt.

In Fraktion I und III wird ADP den Trinukleotiden als Substrat vorgezogen. Eine leichte quantitative Abstufung der Spezifität gegenüber den verschiedenen Trinukleotiden zwischen Fraktion I und III konnte allerdings festgestellt werden. CTP, UTP und ITP wurden in Fraktion III deutlich weniger hydrolysiert als ATP. Die relative Aktivität mit PNPP ist in Fraktion III niedriger als in Fraktion I. Die niedrige Substratspezifität für ATP in Fraktion III in Kombination mit der ADPase-Aktivität und der hohen Hemmstoffkonzentration, die für eine 50 %ige Inhibition nötig ist

(s.o.), legen nahe, daß neben Plasmalemma-ATPase auch vakuoläre unspezifische Phosphatase in dieser Fraktion auftritt.

Tabelle 4: Substratspezifität der Phosphatasen aus den Fraktionen I und III des diskontinuierlichen Gradienten. Mikrosomen aus Blättern von *Plantago maritima* wurden eingesetzt

Substrat (1 mM)	Phosphatase	
	Fraktion I	Fraktion III
ATP	84.8 (100)	43.2 (100)
ADP	148.0 (175)	74.6 (173)
AMP	7.2 (9)	5.1 (12)
GTP	95.8 (113)	52.0 (120)
CTP	88.4 (104)	32.6 (75)
UTP	83.8 (99)	31.4 (73)
ITP	110.8 (131)	38.0 (88)
PP _i	27.6 (32)	29.7 (69)
PNPP	50.2 (59)	15.8 (37)

Die Phosphatase-Aktivität ist in $\mu\text{mol P}_i / \text{mg} \cdot \text{h}$ angegeben. Werte in Klammern sind Prozentangaben im Verhältnis zur Aktivität mit ATP (= 100 %).

4.2.1.4. Bewertung der Methode

Aus der Vanadat- und DCCD-Sensitivität der ATPase-Aktivität in Fraktion III ist zu folgern, daß die hierin enthaltenen Membranen Plasmalemma enthalten. Dies entspricht auch der Dichte dieser Fraktion, die zwischen 1.15 und 1.20 g/cm³ liegt. Fraktion I enthält vermutlich Tonoplasten, auch dies stimmt mit der niedrigen Dichte dieser Membranen von 1.04 – 1.09 g/cm³ überein. In dieser Fraktion konnte jedoch keine nitratsensitive ATPase festgestellt werden. Fraktion II enthält vermutlich Anteile der beiden genannten Membranen neben Golgi-Vesikeln. Zwar läßt sich auch in *Plantago maritima* Plasmalemma durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation isolieren, doch ist zu berücksichtigen, daß die hierbei erhaltene Präparation deutliche mitochondriale Aktivität zeigt und unspezifische Phosphatase enthält. Die Sensitivität der ATPase-Aktivität gegenüber DCCD und Vanadat ist etwa eine Zehnerpotenz niedriger als in anderen Arten (Gallagher und Leonard 1982, Sze 1985).

Unter Berücksichtigung der Kriterien der Verteilung von Markerenzymen, der Wirkung von Inhibitoren auf die Phosphataseaktivität

und der Spezifität dieser Reaktion bleibt festzuhalten, daß die diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation an dem untersuchten, voll ausdifferenzierten Gewebe keine befriedigenden Resultate für die Isolation von sauberem Plasmalemma liefert. Eine vergleichbare Reinheit, wie sie mehrfach in der Literatur für junges, sich entwickelndes Gewebe aus verschiedenen Arten (Serrano 1984a,b, Sze 1984,1985) und Speichergewebe von *Beta vulgaris* (O'Neill und Spanswick 1984a) beschrieben wurde, konnte nicht erzielt werden. Der bei dieser Methode anfallende zeitliche und apparative Aufwand ist wegen des Zentrifugenlaufes von insgesamt ca. 2 3/4 Stunden in einer Ultrazentrifuge recht hoch.

4.2.2. Wäßriges Zweiphasensystem nach Lundborg et al. (1981) und Yoshida et al. (1983)

Als Alternative zu Saccharosegradienten wurde die Methode des wäßrigen Zweiphasensystems (Lundborg et al. 1981 und Yoshida et al. 1983) in diese Untersuchungen einbezogen.

Löst man die beiden Polymere Dextran (Molgewicht 500.000) und Polyethylenglycol (Molgewicht 4000) in einem wäßrigen Medium, so entsteht bei entsprechend niedrigen Temperaturen eine Mischungslücke in diesem System, die zur Entmischung und Ausbildung von zwei Phasen unterschiedlicher Dichte führt. Hiervon enthält die obere, weniger dichte Phase überwiegend Polyethylenglykol, während sich das Dextran in der unteren Phase anreichert. In diesem System haben Polymergehalt, Salzgehalt und Art und Konzentration des Puffers entscheidenden Einfluß auf die Zusammensetzung der entstehenden Phasen und damit auch auf das Verteilungsverhalten von Biomembranen zwischen den beiden Phasen (Larsson et al. 1984). Die Verteilung der Membranen wird durch die Parameter Hydrophilie und Ladung der Membranoberfläche beeinflusst, beruht also auf völlig anderen physikalischen Eigenschaften als bei der Dichtegradientenzentrifugation.

4.2.2.1. Verteilung von ATPase und Protein aus "crude microsomes" in Zweiphasensystemen unterschiedlicher Zusammensetzung

Zunächst wurde durch Variation der Polymerkonzentration und des

KCl-Gehaltes die für die Aufreinigung von Plasmalemma aus *Plantago lanceolata* günstigste Kombination ermittelt. In Tab.5 und Abb.13 sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt.

Tabelle 5: Einfluß der Polymerkonzentration auf den Protein- und ATPasegehalt der Oberphase des Zweiphasensystems. Mikrosoomen aus Blättern und Wurzeln von *Plantago lanceolata* wurden eingesetzt.

Untersuchte Parameter	Z in Oberphase bei Polymerkonzentration		
	5.5 %	6.0 %	6.5 %
Blatt			
Protein	8.2	2.0	0.9
ATPase	4.0	2.0	1.3
Wurzel			
Protein	14.0	3.6	1.0
ATPase	23.0	5.6	1.5

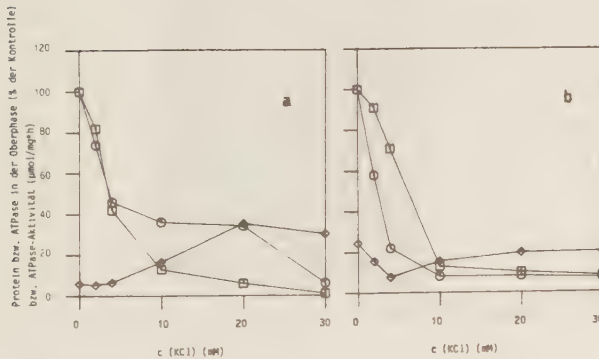


Abb.13: Einfluß von KCl auf die Konzentration von Protein und ATPase in der Oberphase eines Zweiphasensystems mit 5.6% Polymerkonzentration anhand von "crude microsomes" aus a: Blättern und b: Wurzeln von *P.lanceolata*. (□): Protein, (○): ATPase (gesamt) (jeweils in % des Wertes ohne KCl), (◇): ATPase (spez. Aktivität in $\mu\text{mol P}_i/\text{mg} \cdot \text{h}$)

Mit zunehmendem Polymergehalt sinkt der Anteil von Protein und ATPase-Aktivität in der Oberphase drastisch ab, während die spezifische ATPase-Aktivität zumindest bei den Blättern steigt (Tab.5). Ähnliches läßt sich mit zunehmendem KCl-Gehalt feststellen (Abb.13). Für die Standardisolation wurde wegen der hier erzielten höchsten spezifischen Aktivität der ATPase bei noch vertretbarer Proteinmenge in der Oberphase ein System mit je 5.6% Polymer und 30 mM KCl bei 5 mM K-Phosphatpuffer (pH 6.8) gewählt.

4.2.2.2. Verteilung von Markerenzymen auf die Phasen des Zweiphasensystems

Die mit dem Zweiphasensystem isolierten Membranvesikel wurden zunächst auf ihre biochemischen Eigenschaften, d.h. auf die Aktivität verschiedener Markerenzyme für die unterschiedlichen Membranen untersucht. In Tab.6 sind spezifische Aktivitäten dieser Enzyme in den Membranen aus der Oberphase denen aus der Unterphase am Beispiel einer Präparation aus Wurzeln von *Plantago maritima* gegenübergestellt.

Tabelle 6: Verteilung von Markerenzymen auf Ober- und Unterphase des Zweiphasensystems bei einer Präparation aus Wurzeln von *Plantago maritima*.

Enzym	spezifisch für	Gehalt in			
		Oberphase		Unterphase	
		Gesamt	spezif.	Gesamt	spezif.
ATPase (pH 6)	Plasmalemma*	5.85	23.4	118.6	21.6
ATPase-Hemmung durch 45 μ M Vanadat in %	Plasmalemma*		62		5
α -Mannosidase	Tonoplast*	0.05	0.21	7.81	1.42
NADH-Cyt c Reduktase	Tonoplast*	0.0	0.0	15.81	2.86
latente UDPase	Golgi*	0.43	1.7	18.67	3.4
latente IDPase	Golgi*	0.70	2.8	15.90	2.9
Cyt.c Oxidase	Mitochondrien*	0.0	0.0	66.0	12.0
NADPH-Cyt c Reduktase	Endopl.Ret.*	0.81	3.24	22.73	4.14
PNPPase	Unspezifische Phosphatase*	2.1	8.4	103.2	18.8
Protein (mg)		0.25		5.49	

Die spezifischen Aktivitäten sind in $\mu\text{mol Substrat} / \text{mg} \cdot \text{h}$ angegeben, die Gesamtaktivitäten in $\mu\text{mol Substrat} / 80 \text{ g FG} \cdot \text{h}$.
 a: Gallagher und Leonard, 1982; b: Ali und Akazawa, 1986; c: Hodges und Leonard, 1972; d: Chanson et al., 1984.

Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten in den beiden Phasen fällt sofort auf, daß das einzige Enzym, das sich in der Oberphase angereichert hat, die vanadat-hemmbar ATPase, also der Plasmalemma-Marker ist. Die Hemmung der Aktivität ist in den

Membranen aus der Oberphase etwa zwölfmal so hoch wie in der Unterphase. Die Markerenzyme für Mitochondrien und Tonoplast sind in der Oberphase drastisch reduziert bzw. nicht mehr nachweisbar. Die unspezifische Phosphataseaktivität mit dem Substrat PNPP ist ebenfalls erheblich reduziert. Für die Golgi- und ER-Marker konnte eine deutliche Verminderung in der Oberphase konstatiert werden, die allerdings nicht so hoch wie bei Mitochondrien und Tonoplast ausfällt. In einem Zweiphasensystem, das mit "crude microsomes" aus Blättern von *P.lanceolata* durchgeführt wurde, konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Oberphase in Blattpräparationen frei von Verunreinigungen durch Thylakoide ist (Abb.14).



Abb.14: Zweiphasensystem mit "crude microsomes" aus Blättern von *P.lanceolata* nach der Phasentrennung.

4.2.2.3. Einfluß von Phosphatase-Inhibitoren auf die ATPase-Aktivität in Membranen aus dem Zweiphasensystem

Ein weiteres Kriterium für die Reinheit der Membranfraktion ist die Sensitivität der ATPase-Aktivität gegenüber verschiedenen Phosphatase-Inhibitoren. Der Effekt solcher Substanzen wurde an den Plasmalemma-Präparationen untersucht. In Tab.7 finden sich die Ergebnisse dieser Analysen am Beispiel von *P.maritima*-Wurzeln.

Tab.7: Inhibierung der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.maritima* durch Phosphatase-Hemmstoffe

Inhibitor	ATPase-Aktivität (% der Kontrolle)
ohne	100
Oligomycin (10 µg/ml)	92
NaN ₃ (1 mM)	99
Quabain (10 µM)	100
KNO ₃ (45 mM)	101
Na ₂ MoO ₄ (1 mM)	89
Na ₂ VO ₄ (1 mM)	12
DCCD (100 µM)	19

Von den getesteten Inhibitoren zeigen nur DCCD und Vanadat einen deutlichen Hemmeffekt. In Gegenwart von 1 mM Na₂MoO₄ wurde noch eine 11 %ige Hemmung registriert.

4.2.2.4. Substratspezifität der ATPase-Aktivität in Membranen aus dem Zweiphasensystem

Wie bei der Dichtegradientenzentrifugation war es auch bei der Isolation mit dem Zweiphasensystem notwendig, die Substratspezifität der erhaltenen Fraktionen aus Ober- und Unterphase zu analysieren. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Tab.8 dargestellt.

Tabelle 8: Substratspezifität der Phosphatase-Aktivität von Membranen aus Ober- und Unterphase des Zweiphasensystems. Membranen aus *P.maritima*-Wurzeln wurden analysiert.

Substrat	Aktivität (% des Wertes mit ATP)	
	Oberphase	Unterphase
ATP	100	100
ATP/VO ₃ ²⁻	56	67
ADP	37	79
AMP	8	21
GTP	59	99
CTP	51	79
UTP	53	94
ITP	58	93
PP _i	2	49
PNPP	7	49

Die zweite Zeile gibt die ATPase-Aktivität in Gegenwart von 50 µM Na₂VO₄ an.

Während die Phosphatase-Aktivität in der Unterphase alle Trinukleotide etwa gleich stark hydrolysiert und auch mit PNPP noch hohe Aktivität zeigt, ist das in der Oberphase anfallende Membranmaterial sehr spezifisch für ATP. PNPP ergab in dieser Fraktion nur 7 % der mit ATP erhaltenen Aktivität und ATP wurde gegenüber den anderen Trinukleotiden und ADP als Substrat deutlich bevorzugt.

4.2.2.5. Orientierung der Plasmalemmavesikel

Bei einem Pflanzenaufschluß anfallende Membranstücke treten spontan als sphärische Vesikel auf (Sze 1985), in denen Lipidbilayer in zweierlei Konfiguration vorliegen können: entweder liegen sie in derselben oder der umgekehrten Orientierung wie in der Pflanzenzelle vor (sogenannte "right-side-out" oder "inside-out" Vesikel, Sze 1985). Im Falle des Plasmalemmas würde eine right-side-out Orientierung bedeuten, daß der ATP-hydrolysierende, auf der cytoplasmatischen Seite der Membran liegende Anteil der ATPase von außen zugesetztes ATP nicht "sehen" und damit nicht hydrolysieren kann. Das Plasmalemma ist für derartig große und stark negativ geladene Anionen undurchlässig. Zur Identifizierung der Orientierung der erhaltenen Plasmalemmapräparationen wurde dem ATPase-Ansatz daher das Detergenz TRITON X-100 zugesetzt, das die Membranpermeabilität deutlich erhöht. Der dabei auftretende Effekt ist in Abb.15 am Beispiel einer Präparation aus Wurzeln von *P.lanceolata* demonstriert.

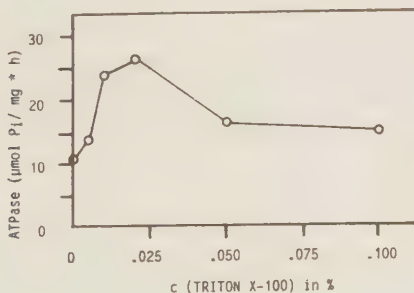


Abb.15: Einfluß von TRITON X-100 auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma-Vesikeln aus Wurzeln von *P.lanceolata*.

Schon geringe Detergenzkonzentrationen (0.018 %) führen zu einer

Verdreifachung der Enzymaktivität. Mit weiter zunehmendem Detergenzgehalt sinkt die ATPase-Aktivität jedoch ab. Das Experiment zeigt also, daß der überwiegenden Teil der erhaltenen Vesikel in "right-side-out"-Orientierung vorliegt.

4.2.2.6. Bewertung der Methode

Hinsichtlich der Verteilung von Protein und Markerenzym auf Ober- und Unterphase von ähnlichen Zweiphasensystemen wurden mit den hier vorgelegten Ergebnissen vergleichbare Resultate von Yoshida et al. (1983) für *Dactylis glomerata* beschrieben. Diese Autoren setzten als Salz im Zweiphasensystem allerdings NaCl ein. In meinen Untersuchungen wurde stattdessen KCl verwendet, um möglichst wenige verschiedene Kationen auf die ATPase einwirken zu lassen und ein System zu verwenden, das dem physiologischen Zustand nahe kommt.

Ein Vergleich der Verteilung von Markerenzymen auf Ober- und Unterphase mit Literaturdaten von Kulturpflanzen ergibt ein zufriedenstellendes Ergebnis. Widell et al. (1982) konnten ebenso wie Uemura und Yoshida (1983) für *Avena sativa* bzw. *Secale cereale* zeigen, daß im Zweiphasensystem die mitochondrialen Membranen nahezu vollständig in die Unterphase gedrängt werden. Gleiches galt für den Tonoplasten-Marker NADH-Cyt c Reduktase (Uemura und Yoshida 1983). Für die Verteilung der IDPase als Golgi-Marker erreichten diese Autoren ein Verhältnis von 3 zu 10 zwischen Ober- und Unterphase. Dieses Ergebnis, das dem in Tab.6 für die latente UDPase ähnlich ist, läßt sich entweder so interpretieren, daß das Zweiphasensystem nicht so selektiv für Golgi-membranen trennt wie für die anderen Membranen, oder daß es sich bei dem in der Oberphase beobachteten Anteil um eine Nebenaktivität der ATPase handelt.

Der fehlende Hemmeffekt von Azid und Oligomycin bestätigt, daß die Membranen in der Oberphase frei von mitochondrialer Kontamination sind. Die 11 Xige Inhibition durch 1 mM Na_2MoO_4 entspricht dem Effekt, den Gallagher und Leonard (1982) für hohe Molybdat-Konzentrationen auf die Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *Zea mays* beschreiben. Auch durch die Inhibitorstudie konnte also bewiesen werden, daß die mit dem Zweiphasensystem erhaltenen

Präparationen einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweisen.

Hinsichtlich der Substratspezifität der erhaltenen Membranen fällt auf, daß in beiden Fraktionen, also Ober- und Unterphase der Anteil an ADPase-Aktivität deutlich niedriger als in den mit der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Membranen ist. Möglicherweise wurde diese Aktivität durch die Behandlung der Membranen mit den hohen Polymerkonzentrationen und den insgesamt ca. 37 mM K^+ teilweise abgewaschen.

Der hemmende Effekt hoher TRITON-Konzentrationen auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma-Vesikeln aus Zweiphasensystemen wurde auch von Larsson et al. (1984) und Wingstrand (1985) beobachtet und kann auf Störung der Protein-Membran-Wechselwirkung durch das Detergenz zurückgeführt werden. Hierdurch würde sich die Konformation des Enzyms und damit möglicherweise die spezifische Aktivität ändern. Aus der Stimulation der ATPase-Aktivität durch niedrige Detergenz-Konzentrationen ist zu folgern, daß der überwiegende Anteil der Vesikel right-side-out Orientierung zeigt, wie dies auch in den gerade zitierten Arbeiten beobachtet wurde. Die Grundaktivität in Abwesenheit von Detergenz kann verschiedene Ursachen haben. Entweder liegt ein Teil der Vesikel in inside-out Orientierung vor oder ist undicht (Sze 1985), oder den Membranen haftet eventuell beidseitig vakuoläre unspezifische Phosphatase an.

Da ein 0.018 Ziger TRITON-Zusatz offenbar die optimale Enzymaktivität liefert, enthielten alle späteren Enzymtests das Detergenz in dieser Konzentration.

Der Befund, daß die Plasmalemmavesikel überwiegend in der right-side-out Konfiguration vorliegen, erklärt auch das unterschiedliche Verteilungsverhalten dieser Vesikel im Zweiphasensystem gegenüber allen anderen Membransystemen. Die Außenseite des Plasmalemmas ist nämlich die einzige Lipidschicht, die *in vivo* der in ihren Ioneneigenschaften überwiegend von anorganischen Komponenten dominierten Zellwand ausgesetzt ist. Sämtliche anderen Membranoberflächen haben Kontakt zu cytoplasmatischen Komponenten bzw. zum Vakuolensaft, der einen großen Anteil an organischen Substanzen enthält. Von allen vorhandenen Membranoberflächen hat also offenbar nur die Plasmalemma-Außenseite noch positive Lö-

sungseigenschaften in der polyethylenglykolreichen Oberphase des Zweiphasensystems. Alle anderen Membranen werden wegen ungünstiger Wechselwirkungen mit der Oberphase in die Unterphase gedrängt.

Die mit dem Zweiphasensystem isolierten Membranen zeigen eine deutlich größere Reinheit als die aus der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen. Dies wurde aufgrund der Kriterien Verteilung der Markerenzyme, Wirkung von Phosphatase-Inhibitoren und Spezifität der ATPase-Aktivität festgestellt. Da die Methode außerdem in kürzerer Zeit (ca. 1 3/4 Stunden) ohne Verwendung einer Ultrazentrifuge durchführbar ist, wurde ihr der Vorzug vor der Dichtegradientenzentrifugation gegeben.

Die Verteilung von Protein-, ATPase- und vanadathemmbarer ATPase-Gehalten auf die bei dieser Methode anfallenden Fraktionen ist in Tab.9 dargestellt. Eine Darstellung des Isolationsverlaufes in Form eines Flußdiagrammes findet sich in Tab.10.

Tabelle 9: Verteilung von Protein, ATPase und Vanadat-hemmbarer ATPase auf die bei der Plasmalemma-Isolation anfallenden Fraktionen aus einer Präparation aus *P.lanceolata* Wurzeln.

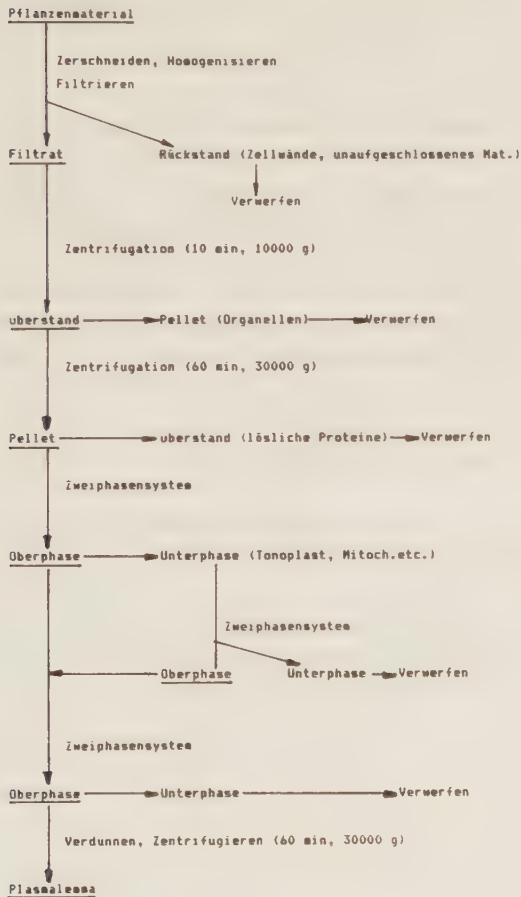
Fraktion	Protein		ATPase		
	mg/g FB	%	$\mu\text{mol P}_i/\text{mg h}$	%	% VO_2^{3-}
Crude microsomes	0.46	2.1	15.6	1.1	91
30000 g-überstand	21.2	97.9	31.1	98.9	98
Unterphase	0.17	0.8	20.4	0.5	92
Oberphase	0.01	0.04	14.0	0.02	51

Die Prozentangaben beziehen sich auf das gesamte nicht-organelle gebundene Protein. Die letzte Spalte gibt die ATPase-Aktivität im Gegenwart von $50 \mu\text{M Na}_2\text{VO}_4$ im Reaktionsansatz in Prozent der Kontrolle an.

Organelle gebundenes Protein, d.h. bei der 10000 g Zentrifugation im Pellet anfallendes Material wurde in der Aufstellung von Tab.9 nicht berücksichtigt. Von dem im Überstand dieses ersten Zentrifugationsschrittes verbleibenden Protein sind etwa 98 % löslich

und treten im Überstand der 30000 g Zentrifugation auf. Dieser Überstand enthält auch ca. 99 % der nicht organellgebundenen ATPase-Aktivität, die allerdings völlig insensitive gegenüber Vanadat ist und aus der unspezifischen Phosphatase resultiert.

Tabelle 99: Flußdiagramm für die Isolation von Plasmalemma aus Wurzeln und Blättern von *Platago*



An Lipidvesikel (und mithin das Pellet des zweiten Zentrifugationsschrittes) gebunden sind lediglich 2 % des Proteins und 1 % der ATPase-Aktivität aus dem Überstand der ersten Zentrifugation. Auch diese ATPase ist wenig vanadatempfindlich, ein deutlicher

Hinweis darauf, daß neben Plasmalemma-ATPase eine ganze Reihe von Phosphohydrolasen in dieser Fraktion zu finden sind. Das Zweiphasensystem bringt hier jedoch einen großen Schritt zur Aufreinigung, wie der Anstieg der Vanadat-Hemmung von 9 auf 49 % im protokollierten Experiment zeigt. Eine weitere Charakterisierung des in der Oberphase anfallenden Materials sei den folgenden Kapiteln vorbehalten. Es ist allerdings an dieser Stelle erwähnenswert, daß in dieser Fraktion, die den Ausgangspunkt aller weiteren Untersuchungen darstellt, nur noch etwa 3-10 µg Protein pro g Frischgewicht anfallen (Tab.6 und 9).

Die bisher aus der Literatur bekannten Analysen von Plasmalemma aus Zweiphasensystemen wurden durchweg an jungem, sich entwickelndem Gewebe (Wurzelspitzen, Keimlinge, etiolierte Coleoptile) durchgeführt. Da wegen des relativ langsamen Wachstums der untersuchten Arten als Ausgangsmaterial für diese Untersuchungen nur voll ausdifferenziertes Gewebe zur Verfügung stand, war die sehr gute Qualität der erhaltenen Präparationen nicht *a priori* zu erwarten gewesen. Die Ausbeuten an Membranproteinen von ca. 3-10 µg/g FG entsprechen den aus der Literatur bekannten Daten (Uemura und Yoshida 1983). Sie stellen allerdings den limitierenden Faktor der biochemischen Analysen dar.

Mit der Modifizierung und Optimierung von Aufschlußverfahren und Zweiphasensystem für die zu untersuchenden Arten sind nun die methodischen Voraussetzungen gegeben, zum ersten Mal die Rolle plasmalemmagebundener Transportenzyme für die Salztoleranz verschiedener Wildpflanzen an sauberem Plasmalemma zu studieren.

5. Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase aus unterschiedlich salztoleranten *Plantago*-Arten

Nach Schaffung der methodischen Voraussetzungen zur Isolierung sauberen Plasmalemmas aus den Untersuchungsobjekten galt es nun festzustellen, ob sich salztolerante und salzsensitive *Plantago*-Arten hinsichtlich plasmalemmagebundener Transport-ATPasen unterscheiden. Die Untersuchungen hierzu wurden in drei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmalemma unter nativen Bedingungen analysiert. Die ersten Studien wurden an Pflanzen verschieden salztoleranter Arten durchgeführt, die unter den gleichen, nicht salinen Bedingungen angezogen wurden. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluß saliner Kulturbedingungen auf native Plasmalemma-ATPase studiert. Schließlich wurde im dritten Schritt versucht, aktive Plasmalemma-ATPase aus den Membranen zu solubilisieren und aufzureinigen und ihre Eigenschaften in definierter Umgebung zu analysieren. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dargestellt, die an nativem Plasmalemma gewonnen wurden.

5.1. Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase unter nicht salinen Kulturbedingungen

5.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitor-Wirkungen

Die Hemmung durch DCCD und Vanadat ist ein Charakteristikum der aus Kulturpflanzen beschriebenen Plasmalemma-ATPase (Kap.2.3.). Auch in *P.maritima* war bei der Überprüfung der Reinheit der isolierten Membranen festgestellt worden, daß die membranboundene ATPase-Aktivität durch diese Substanzen gehemmt wird (Kap.4.2.2.3.). In diesem Abschnitt wird die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes bei einer salztoleranten und einer salzsensitiven *Plantago*-Art beschrieben. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, weil sich beim Studium des Hemmeffektes an Plasmalemma aus Dichtegradienten gezeigt hatte, daß die ATPase-Aktivität aus *P.maritima* erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen inhibiert wird (Kap.4.2.1.2.). Es sollte geklärt werden, ob dieses Ergebnis durch Kontamination in der Fraktion aus dem Dichtegradienten verursacht wurde oder eine Eigenschaft von Plasmalemma-ATPase aus dieser Art ist.

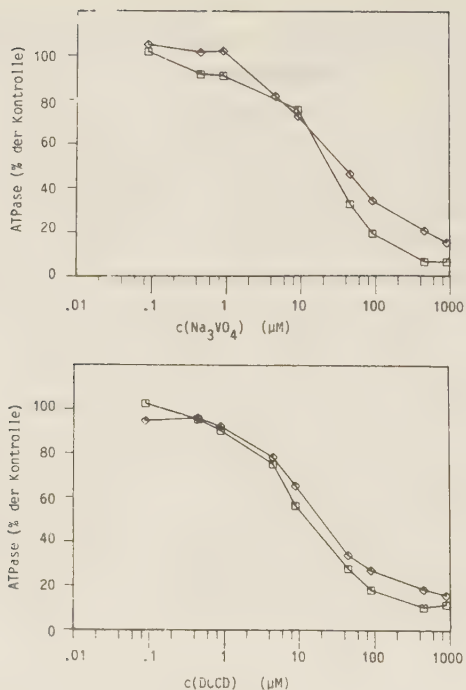


Abb.16: Einfluß von Na_3VO_4 und DCCD auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma-Vesikeln aus Wurzeln von ($\diamond$) *P. lanceolata* und ($\square$) *P. maritima*.

Vanadat hemmt das Enzym aus beiden Arten gleichermaßen (Abb.16). Eine Reduzierung der Aktivität auf die Hälfte wurde bei 25 - 40 μM Inhibitorkonzentration festgestellt. Dieser Wert (I_{50} -Wert) liegt für DCCD in beiden Arten bei 15 - 30 μM . Es konnte also gezeigt werden, daß die in Fraktion III des diskontinuierlichen Dichtegradienten beobachteten I_{50} -Werte von 500 μM Inhibitor nicht spezifisch für die untersuchten Arten sind, sondern offenbar auf Kontamination beruhen.

5.1.2. pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität

Plantago major ssp. *major*, *P. media*, *P. lanceolata* und *P. maritima* zeigen enge pH-Optima der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln. Die Maxima liegen im Bereich von pH 6.0-6.3. *P. coronopus* und *P. crassifolia* dagegen zeigen breitere pH-Optima mit Maxima um pH 6.5 (alle Abb.17).

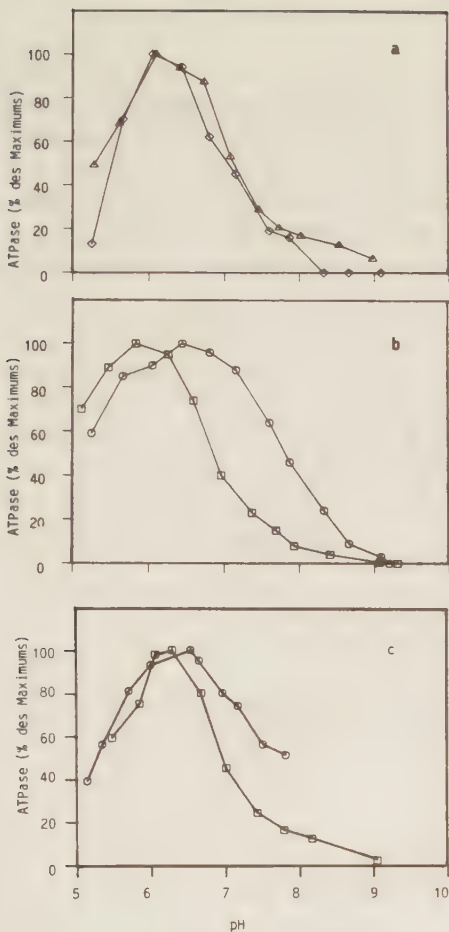


Abb.17: Einfluß des pH-Wertes auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma aus Wurzeln von a: ($\diamond$) *P. lanceolata*, ($\triangle$) *P. major* ssp. *major*; b: ($\square$) *P. maritima*, ($\circ$) *P. coronopus*; c: ($\square$) *P. media* und ($\circ$) *P. crassifolia*.

Die untersuchten Arten lassen sich anhand der Breite der beobachteten pH-Optima in zwei Gruppen einteilen. Diese Einteilung korreliert aber nicht mit der Salztoleranz der Untersuchungsobjekte. Berücksichtigt man, daß die unspezifische Phosphatase ein sehr ähnliches, breites Optimum zeigt, wie es in der zweiten Gruppe auftritt, so kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Verbreiterung der Optima durch locker an das Plasmalemma assoziierte Phosphatase vorliegt, die in den Präparationen aus verschiedenen Taxa in unterschiedlicher Konzentration auftreten kann.

In *Plantago lanceolata*, *P. major* ssp. *major* und *P. maritima* wurde auch die pH-Abhängigkeit von Plasmalemma-ATPase aus Blättern untersucht (Abb. 18). In allen Fällen wurden enge pH-Profile mit Maxima zwischen pH 6.0 und 6.3 beobachtet. Unterschiede zu entsprechenden Präparationen aus Wurzeln konnten bei diesen Arten nicht festgestellt werden. Dies zeigt, daß das Enzym in Sproß und Wurzel derselben Art sehr ähnliche biochemische Eigenschaften hat.

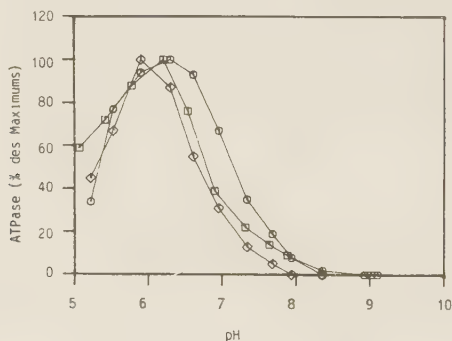


Abb. 18: Einfluß des pH-Wertes auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma aus Blättern von (□) *P. lanceolata*, (◇) *P. major* ssp. *major* und (○) *P. maritima*.

5.1.3. Substratspezifität

In Kap. 4.2.1.3. hatte sich gezeigt, daß plasmalemmagebundene Phosphatase nur sehr niedrige Substratspezifität zeigte, wenn die Membranen über einen Dichtegradienten geerntet wurden. Die Spezifität war in Präparationen aus dem Zweiphasensystem deutlich höher (Kap. 4.2.2.4.). Eine vergleichende Darstellung dieser Eigenschaften in den untersuchten Präparationen von Plasmalemma aus Wurzeln von *Plantago major*, *P. media*, *P. lanceolata*, *P. maritima* und *P. coronopus* ist in Tabelle 11 wiedergegeben.

Es zeigt sich, daß die ATPase in allen fünf Arten durch $45 \mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$ um ca. 35 bis 70 % gehemmt wird. Während AMP fast gar nicht hydrolysiert wird, die Phosphoresterbindung also stabil ist, tritt mit ADP noch eine begrenzte Hydrolyse auf (bis zu 23 %). Andere Trinukleotide werden bis zu 35 % als Substrat angenommen, eine durchgängige Präferenz für eines der vier getesteten

Trinukleotide ist in den nativen Präparationen nicht auszumachen. Auch mit dem künstlichen Substrat p-Nitrophenylphosphat kann begrenzte Hydrolyse bis zu ca. 30 % beobachtet werden. Eine deutliche Korrelation wurde zwischen dem Ausmaß der unspezifischen Aktivität (mit PNPP) und dem Ausmaß der Hemmbarkeit durch Vanadat gefunden: je höher die unspezifische Aktivität ist, desto weniger läßt sie sich durch Vanadat hemmen. Dieses Ergebnis kann in Kombination mit dem an einer anderen Präparation aus *P. maritima* gefundenen I_{50} -Wert von 25 μM Vanadat (Kap.5.1.1.) als Hinweis darauf gewertet werden, daß die Verunreinigung durch unspezifische Phosphatase von Präparation zu Präparation in gewissen Grenzen schwanken kann und die bei dieser Analyse verwendeten Membranen von *P. major* und *P. maritima* etwas stärker damit kontaminiert sind, als dies bei den anderen Arten der Fall ist.

Tab.11: Spezifität nativer Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *Plantago*-Taxa

Substrat (0.9 mM)	relative Aktivität (% der Aktivität mit ATP)				
	<i>major m.</i>	<i>media</i>	<i>lanceolata</i>	<i>maritima</i>	<i>coronopus</i>
ATP	100	100	100	100	100
ATP/ VO_4^{3-}	66	33	43	56	32
ADP	22	23	8	9	11
AMP	10	3	0	7	8
GTP	35	24	30	18	13
CTP	6	37	14	9	30
UTP	11	33	30	12	9
ITP	0	21	3	32	4
PP_i	28	11	8	22	5
PNPP	28	12	16	33	6

Die zweite Zeile gibt die Akt. in Ggw. von 50 μM Na_2VO_4 an.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Plasmalemma-Präparationen aus allen fünf Arten eine Phosphatase-Aktivität aufweisen, die sehr spezifisch für ATP ist.

5.1.4. Einfluß zweiwertiger Kationen auf die ATPase-Aktivität

Nach Sze (1984,1985) und Serrano (1984a) benötigt die Plasmalemma-ATPase Mg^{2+} für ihre Aktivität. Dies ließ sich auch für die vier Arten *P. major*, *P. lanceolata*, *P. maritima* und *P. coronopus* zeigen (Tab.12).

In Abwesenheit zweiwertiger Kationen liegt die Aktivität bei

maximal 42 % derjenigen des Kontrollansatzes mit Mg^{2+} . Dieses Ion kann nur durch Mn^{2+} und Co^{2+} ersetzt werden, alle anderen getesteten Metalle lieferten erheblich niedrigere Aktivitäten. Zn^{2+} ergibt noch eine mittlere Stimulation. Ein wichtiges Ergebnis ist, daß Ca^{2+} gegenüber dem Ansatz ohne zweiwertiges Kation fast keine Erhöhung der Aktivität bringt. Selbst bei je 0.45 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} liegt die Aktivität exakt bei dem Wert, der mit Ca^{2+} alleine erreicht wird. Für eine durch Ca^{2+} stimulierte ATPase-Aktivität in den isolierten Plasmalemma-Vesikeln konnte also kein Hinweis gefunden werden.

Tab.12: Einfluß zweiwertiger Kationen auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma aus Wurzeln

Kation (0.9 mM)	ATPase (% der Kontrolle)			
	<i>P.major</i>	<i>P.lanceolata</i>	<i>P.maritima</i>	<i>P.coronopus</i>
ohne	21	42	30	9
Mg^{2+}	100	100	100	100
Ca^{2+}	37	47	34	21
Sr^{2+}	30	43	28	8
Ba^{2+}	19	51	27	10
Mn^{2+}	127	97	137	102
Zn^{2+}	73	52	47	58
Fe^{2+}	20	68	44	15
Cu^{2+}	0	13	5	0
Co^{2+}	168	100	-	129
Ni^{2+}	41	31	-	38
je 0.45 mM				
Mg^{2+}/Ca^{2+}	36	-	-	21

5.1.5. Einfluß von Anionen und einwertigen Kationen

Wegen der unter salinen Bedingungen möglicherweise schwankenden Konzentrationen von einwertigen Kationen im Cytoplasma und der offenen Frage nach der Existenz einer Na/K-ATPase im Plasmalemma von Halophyten war es wichtig, den Einfluß von Salzen einwertiger Kationen auf die Enzymaktivität zu analysieren. Mit dem breiten pH-Optimum der ATPase bot *P.coronopus* die Möglichkeit, den Einfluß verschiedener Salze auf diese Enzymaktivität bei pH 6.0, d.h. in der Nähe des Aktivitätsmaximums und bei pH 7.5, also im vermuteten physiologischen Bereich, zu studieren. Das Ergebnis ist in Tab. 13 wiedergegeben.

Tab.13: Salzeinfluß auf die ATPase-Aktivität
in Plasmalemma aus Blättern von *Plantago coronopus*

Salz (45 mM)	ATPase (% der Kontrolle)	
	pH 6.0	pH 7.5
ohne	100	100
Cholin-Cl	156	-
LiCl	144	-
NaCl	174	-
KCl	188	85
CsCl	178	-
Na ₂ SO ₄	180	-
K ₂ SO ₄	187	92
KNO ₃	181	94
KClO ₃	134	84
KF	21	25
CH ₃ COOK	175	95
K-Citrat	22	15

Während bei pH 6.0 alle K- und Na-Salze außer dem Fluorid und dem Citrat zu einer deutlichen Stimulation der Aktivität führen, konnte ein solcher Effekt bei pH 7.5 nicht beobachtet werden. Der Charakter des Anions scheint nur in drei Fällen Einfluß auf die Aktivität zu haben. Das Nitrat-Analogon Chlorat führt vermutlich durch seine Wirkung als Oxidationsmittel zu einer leichten Senkung der Aktivität gegenüber den anderen Anionen. Der inhibierende Effekt von Fluorid und Citrat, der bei beiden pH-Werten auftrat, hat unterschiedliche Gründe. Während Fluorid als Inhibitor von Phosphorylierungsreaktionen gilt (möglicherweise durch Bildung des Carbonylfluorids mit Aspartat oder Glutamat), ist Citrat in der Lage, sehr stabile Komplexe mit Metallionen zu bilden. Sein inhibierender Effekt beruht also vermutlich darauf, daß es dem MgATP²⁻-Komplex das Zentralion entzieht. Im Gegensatz zur Tonoplasten-ATPase wirken Nitrat nicht inhibierend und Chlorid nicht stärker stimulierend als Sulfat (Sze 1984).

Der Versuch mit *P.coronopus* hatte gezeigt, daß der stimulierende Effekt von K⁺ und Na⁺ offenbar pH-abhängig ist. Anhand von Plasmalemma aus Wurzeln des anderen Halophyten *P.maritima* wurde die pH-Abhängigkeit der Stimulation durch KCl untersucht (Abb.19).

Die Stimulierung der ATPase-Aktivität durch KCl ist eng auf den pH-Bereich um pH 6.0 begrenzt und führt etwa zu einer Verdoppe-

lung der Enzymaktivität im Maximum.

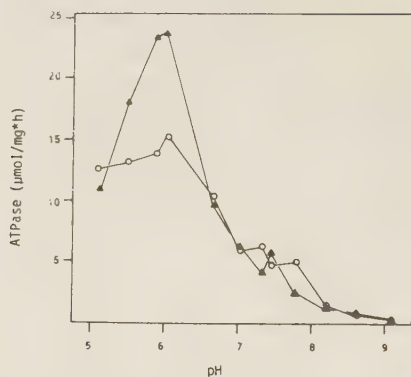


Abb.19: pH-Abhängigkeit der ATPase-Stimulation durch KCl in Plasmalemma aus *Platanus*-Wurzeln. (○): ohne KCl, (▲): 45 mM KCl im Testansatz.

Um festzustellen, ob einwertige Kationen möglicherweise eine regulierende Funktion für die Aktivität der ATPase bei pH-Werten unter 7 haben können, wurde eine Reihe von Analysen zur Konzentrationsabhängigkeit des stimulierenden Effektes durchgeführt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation durch K^+ und Na^+ wurde an Präparationen aus Wurzeln und Blättern von vier Arten untersucht (Abb.20-22).

In allen untersuchten Präparationen konnten Aktivitätssteigerungen um 50 - 100 % festgestellt werden. Im Falle einiger Präparationen aus Blättern waren die Effekte noch größer. K_2SO_4 und Na_2SO_4 führten ebenso wie KCl und NaCl zu einer Aktivitätssteigerung. Während in allen Fällen halbmaximale Stimulation bei Konzentrationen um 3 - 15 mM Kation beobachtet wurde, variierte das Ausmaß der Aktivitätssteigerung deutlich. Diese unterschiedliche Reaktion zwischen verschiedenen Präparationen war nicht artspezifisch. Dies läßt sich durch einen Vergleich der Stimulationen mit Tabelle 14 belegen, in der der Einfluß verschiedener einwertiger Kationen auf die ATPase-Aktivität in Wurzel-Plasmalemma bei vier *Plantago*-Arten zusammengestellt ist. Die Höhe der Stimulation kann also zwischen verschiedenen Präparationen aus derselben Art schwanken. Dies kann mit unterschiedlichen Anteilen z.B. unspezifischer Phosphatase in den Präparationen zusammenhängen, die von Aufschluß zu Aufschluß variieren können.

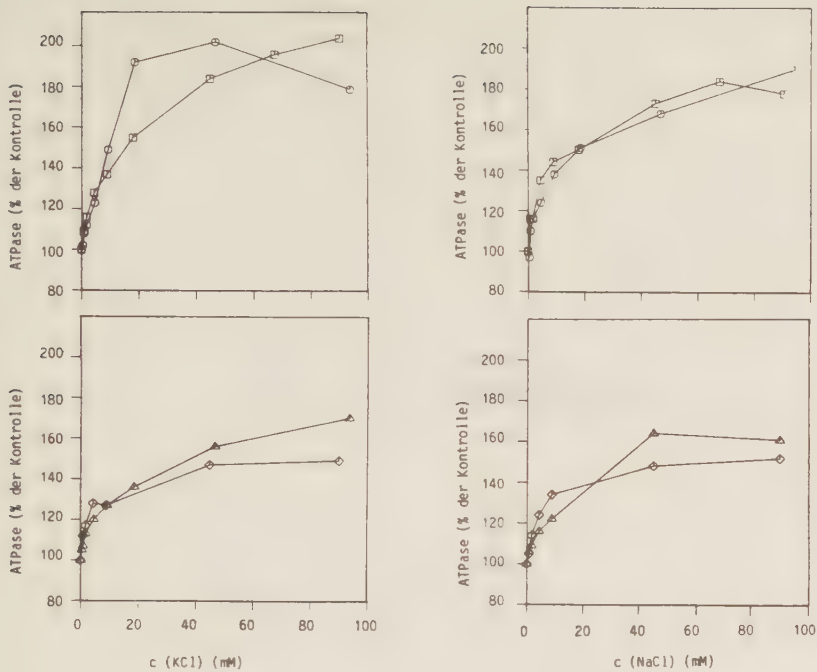


Abb.20: Stimulation der Plasmalemma-ATPase durch KCl und NaCl in Präparationen aus Wurzeln von (◇) *P. lanceolata*, (△) *P. major* ssp. *major*, (□) *P. maritima* und (○) *P. coronopus*.

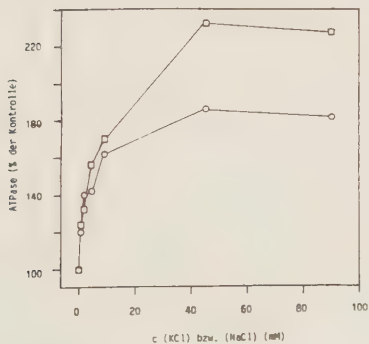


Abb.21: Stimulation der membrangebundenen ATPase durch KCl und NaCl in Blatt-Plasmalemma aus *P. maritima*. (□):KCl, (○):NaCl.

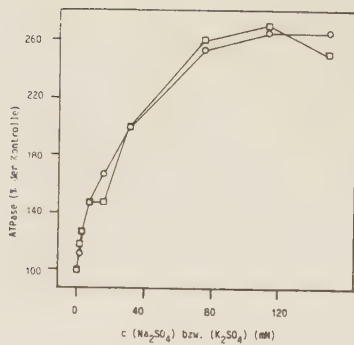


Abb.22: Stimulation der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.coronopus* durch ($\square$) K_2SO_4 und ($\circ$) Na_2SO_4 .

Tab.14: Stimulation der ATPase-Aktivität durch einwertige Kationen

Kation (45 mM)	ATPase (% der Kontrolle mit KCl)			
	<i>P.major</i>	<i>P.lanceolata</i>	<i>P.maritima</i>	<i>P.coronopus</i>
ohne	50	49	67	48
LiCl	64	81	78	60
NaCl	81	96	97	81
KCl	100	100	100	100
NH_4Cl	-	103	96	81
CsCl	110	101	101	99

In allen vier Arten konnte eine Stimulation der Aktivität durch einwertige Kationen in der Reihenfolge $\text{Cs}^+ \geq \text{K}^+ \geq \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ festgestellt werden. Der Effekt scheint also deutlich vom Ionenradius abhängig zu sein.

Konzentrationen von 80 - 150 mM K^+ im Cytoplasma sind realistische Werte (Briskin 1986), so daß das Enzym auch in der Zelle in dem durch K^+ stimulierten Zustand vorliegt. Es ist daher bei allen Analysen der Enzymaktivität sinnvoll, entsprechende K^+ -Konzentrationen im Assay aufrechtzuerhalten. Eine regulatorische Wirkung des K^+ -Spiegels im Cytoplasma auf die ATPase-Aktivität erscheint unwahrscheinlich, da das Enzym bei allen bisher gemessenen cytoplasmatischen K^+ -Konzentrationen in maximaler Aktivität vorliegt.

Die tierische Na/K-ATPase transportiert diese beiden Kationen im

Austausch über die Plasmamembran. Auf die Existenz eines solchen Enzym bei höheren Pflanzen und insbesondere Halophyten gibt es einige Literaturhinweise (Erdei und Kuiper 1979, Vakhmistrov et al. 1982, Wingstrand 1985 und dort zitierte Literatur). Das tierische Enzym wird kooperativ durch Na^+ und K^+ stimuliert (Cantley 1981). Deshalb wurde der Einfluß verschiedener kombinierter Konzentrationen dieser beiden Kationen am Beispiel des Glykophyten *P. lanceolata* und des Halophyten *P. maritima* untersucht (Abb.23).

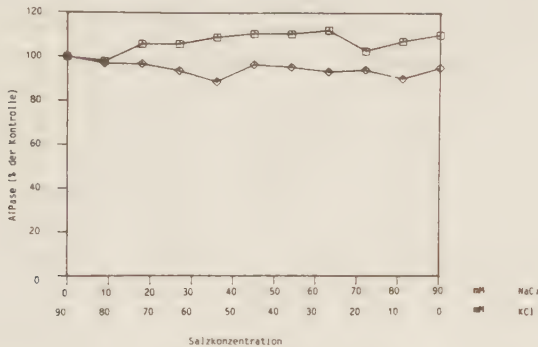


Abb.23: Einfluß kombinierter Addition von KCl und NaCl auf die Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von $\diamond$ *P. lanceolata* und $\square$ *P. maritima*.

Unter allen gewählten Kombinationen blieb die ATPase-Aktivität konstant. Synergistische Effekte konnten nicht festgestellt werden. Auch eine regulatorische Wirkung bestimmter Na^+/K^+ -Verhältnisse auf die ATPase kann demnach ausgeschlossen werden.

5.1.6. Kinetik der ATPase-Reaktion

Tonoplasten-, Mitochondrien- und Plasmalemma-ATPase unterscheiden sich bei den bisher untersuchten Kulturpflanzen in ihren kinetischen Eigenschaften (Sze 1984). Die Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Reaktion in nativen Plasmalemmavesikeln wurde auch in den *Plantago*-Arten untersucht. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abb. 24 dargestellt.

In allen sechs Fällen konnte Sättigungskinetik nach Michaelis-

menten beobachtet werden. Die aus Lineweaver-Burk-Plots ermittelten kinetischen Daten sind in Tab.15 zusammengestellt.

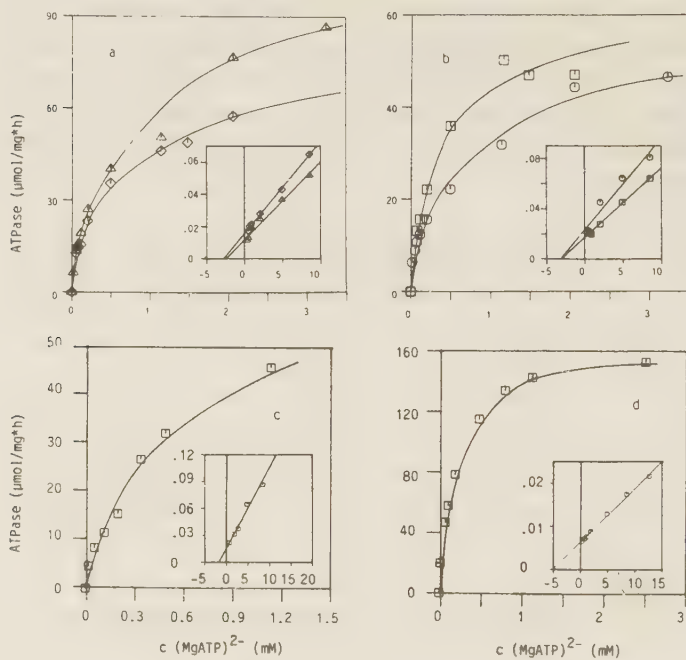


Abb.24: Konzentrationsabhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von a: ($\diamond$) *P. lanceolata*, ($\triangle$) *P. major ssp. major*, b: ($\square$) *P. maritima*, ($\circ$) *P. coronopus*, c: *P. media* und d: *P. crassifolia*. Kleine Zeichnungen: Lineweaver-Burk-Plots

Tab.15: Kinetische Daten der ATPase-Reaktion von Plasmalemma aus Wurzeln

Plantago-Spezies	K_m (mM)	v_{max} ($\mu\text{mol/mg}\cdot\text{h}$)	Anzuchtbedings. (% Bruch)
major ssp. major	0.41	76	50
media	0.45	61	50
lanceolata	0.36	61	25
maritima	0.32	57	25
coronopus	0.31	42	25
crassifolia	0.23	167	50

Alle K_m -Werte liegen mit 0.23 bis 0.45 mM $(\text{MgATP})^{2-}$ etwa in dem aus der Literatur bekannten Bereich (0.3 - 0.5 mM, Sze 1985). Der

niedrigere Wert bei *P. crassifolia* fällt etwas aus dem sonst einheitlichen Spektrum von 0.31 bis 0.45 mM heraus.

Beim Vergleich der Maximalaktivitäten der untersuchten Arten untereinander fällt *P. crassifolia* mit einer wesentlich höheren Aktivität aus dem sonst einheitlichen Rahmen heraus. Diese Art hat im Verhältnis zu allen anderen untersuchten Spezies ein extrem niedriges Wurzel/Sproß Verhältnis von etwa 1:20. Eine relativ geringe Wurzelmenge muß daher den gesamten Wasser- und Ionenfluß zum Sproß aufrechterhalten. Dies mag eine Erklärung für die hohe Aktivität sein. Bei den anderen Arten zeigt sich, daß die mit höheren Nährstoffkonzentrationen angezogenen Pflanzen auch höhere Maximalaktivitäten aufweisen. In einer Reihe späterer Experimente wurden auch *P. lanceolata* und *P. maritima* mit 50 %iger Bruch'schen Lösung angezogen. In diesen Fällen wurde eine bis zu zweifache Erhöhung der ATPase-Aktivität von ca. 30 auf ca. 60 $\mu\text{mol P}_i/\text{mg th}$ unter den Standard-Versuchsbedingungen (pH 6.1, 0.9 mM ATP) beobachtet. Eine verbesserte Nährstoffversorgung führt also zu einer höheren spezifischen Aktivität der Plasmalemma-ATPase in den Wurzeln.

5.1.7. Diskussion der Ergebnisse und Schlußfolgerungen aus der Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase

Ein Vergleich der beobachteten Inhibitorkonzentrationen, die zu 50 %iger Hemmung der ATPase-Aktivität führen, mit Literaturdaten zeigt, daß diese Konzentrationen nur wenig höher liegen als von O'Neill und Spanswick (1984b) und Vara und Serrano (1982) für solubilisierete ATPase aus *Beta vulgaris* und *Avena sativa* angegeben (3 - 20 μM). Sie sind etwas niedriger, als es von Gallagher und Leonard (1982) für drei Getreidearten und von Uemura und Yoshida (1986) für *Helianthus tuberosus* berichtet wird (jeweils über 100 μM).

Mit Hilfe der Bindung von DCCD und Vanadat lassen sich Aussagen darüber machen, welche Aminosäuren im Enzym für die Funktion essentiell sind. So bindet DCCD kovalent an Aspartat- oder Glutamat-Carboxylgruppen nach dem in Abb.25 gezeigten Reaktionsschema (Solioz 1984). Hierdurch wird eine Protonentranslokation über die Carboxylgruppe verhindert. Wenn beispielsweise die Ablösung

eines protonierten Phosphates aus sterischen Gründen nur unter Protonenabgabe möglich ist, wie es bei der F_0-F_1 -ATPase dargestellt wurde (Kap.2.1.), wird dadurch auch die ATPase-Reaktion selber blockiert. Im Falle der Plasmalemma-ATPase erscheint es dagegen sehr wahrscheinlich, daß DCCD durch kovalente Bindung an die essentielle Aspartat-Gruppe wirkt, die im reaktiven Intermediat phosphoryliert ist (Briskin und Poole 1983).

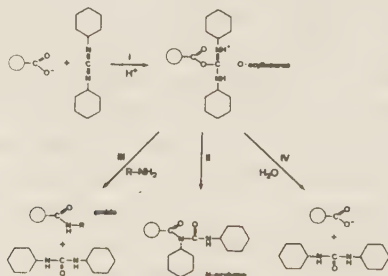
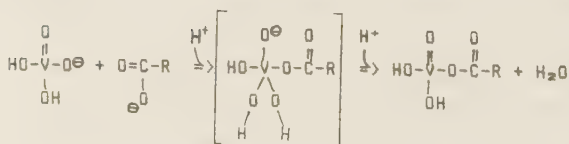


Abb.25: Reaktion von DCCD mit sauren Aminosäuren (Solioz 1984).

Vanadat kann ebenso wie Phosphat trigonal-bipyramidale Übergangsstufen bilden. Durch nukleophile Addition der Carboxylgruppe kann ein Aspartyl-Vanadyl-Anhydrid entstehen, das nicht mehr für die ATPase-Reaktion zur Verfügung steht (Abb.26).

Abb.26: Nukleophile Addition der Aspartat-Carboxylfunktion an Vanadat.



Die Hemmung der ATPase-Aktivität durch DCCD und Vanadat (Abb.16) zeigt, daß Plasmalemma-ATPase aus *P.maritima* und *P.lanceolata* ebenfalls essentielle Aspartat- und/oder Glutamat-Gruppen enthält.

Die Konzentrationen, bei denen der Hemmeffekt auftritt, liegen

bei den Präparationen aus dem wäßrigen Zweiphasensystemen im selben Bereich wie für das solubilisierete Enzym aus *Beta vulgaris* und *Avena sativa* (O'Neill und Spanswick 1984b, Vara und Serrano 1982). Dies kann als Hinweis auf funktionelle Ähnlichkeit im Ablauf der ATPase-Reaktion mit den Enzymen aus diesen Arten interpretiert werden. Bei der ATPase-Aktivität im Plasmalemma aus dem diskontinuierlichen Dichtegradienten war eine erheblich höhere Hemmstoffkonzentration erforderlich, um eine 50 %ige Inhibition zu erreichen (Kap.4.2.1.2.). Es scheint daher ein Zusammenhang zwischen der Reinheit der Präparationen und der Sensitivität der ATPase-Aktivität gegenüber DCCD und Vanadat zu bestehen. Dieser Eindruck läßt sich anhand eines Literaturvergleichs bestätigen. Bei den Präparationen von Gallagher und Leonard (1982) handelt es sich um aus Gradienten geerntetes Plasmalemma, bei denen von Uemura und Yoshida (1986) um Plasmalemma aus Zweiphasensystemen. In beiden Arbeiten wird von I_{50} -Werten über 100 μ M berichtet. O'Neill und Spanswick (1984b) zeigten, daß beim Übergang von nativer zu solubilisierter und rekonstituierter ATPase aus *Beta vulgaris* der I_{50} -Wert auf ein Drittel absinkt. Möglicherweise wird die native Plasmalemma-ATPase durch kontaminierende Proteine oder geeignete Lipide teilweise vor der Vanadat- und DCCD-Wirkung geschützt.

Ein Vergleich der beobachteten pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität mit den von Kuiper und Kuiper (1979 a,b) an "crude microsomes" gewonnenen Daten zeigt, daß im Falle von *P. major* ssp. *major*, *P. media* und *P. maritima* in dem isolierten Plasmalemma deutlich schmalere Profile erzielt wurden. Das von diesen Autoren für *P. major* und *P. maritima* beschriebene Nebenmaximum bei pH 8.0 konnte nicht beobachtet werden. Die für "crude microsomes" aus *P. coronopus* publizierte Kurve (Kuiper und Kuiper 1979b) entspricht qualitativ der von mir gefundenen. Im Falle von *P. lanceolata* ist die hier gemessene Kurve deutlich schmäler als die von Kuiper und Kuiper (1979a) publizierte.

Sze (1984) und Serrano (1984a) geben in ihren Reviews pH-Optima von 5.5 bis 7.0 für die bisher untersuchten Kulturpflanzen an. Die hier untersuchten *Plantago*-Taxa liegen damit im unteren Bereich der bekannten Werte. Da die Meßbedingungen durchaus im physiologischen Bereich liegen (45 mM K^+ , 0.9 mM ATP und Mg^{2+}), erhebt sich zumindest für die Gruppe, die scharfe Optima auf-

weist, die Frage, welche Konsequenz ein weit neben dem physiologischen pH von ca. 7.0 bis 7.5 (Sze 1985 und Rasi-Caldogno und Pugliarello 1985) liegendes Maximum auf die *in vivo*-Aktivität des Enzyms hat. Eine denkbare Interpretation dieses Befundes geht dahin, daß in dem genannten physiologischen Bereich eine kleine Änderung des cytoplasmatischen pH-Wertes (z.B. Acidifizierung durch starke Atmungsaktivität) einen sehr viel größeren Einfluß auf die ATPase-Aktivität hat als in der Nähe des Maximums und die Aktivität des Protonentransportes somit über den cytoplasmatischen pH regulierbar ist. In diesem Zusammenhang ist ein aktueller Beitrag von Roos und Slavik (1987) zu erwähnen. Diese Autoren beobachteten in Protoplasten von *Penicillium cyclopium* mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen eine wandständige Cytoplasmaschicht mit einem pH von 5. Direkte elektrophysiologische Messungen des cytoplasmatischen pH unmittelbar am Plasmalemma mit Mikro-pH-Elektroden sind dagegen technisch kaum durchführbar. In Ermangelung entsprechender Daten aus höheren Pflanzen und insbesondere aus *Plantago* ist die Frage der Regulation der ATPase-Aktivität über den cytoplasmatischen pH vorläufig allerdings noch offen.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß im Gegensatz zu den von Braun et al. (1986) an *Atriplex nummularia* gewonnenen Resultaten in den ohne Salz angezogenen Halophyten deutlich ausgeprägte pH-Optima der ATPase festgestellt werden konnten. Nach den vorliegenden Daten scheinen die unterschiedlich salztoleranten *Plantago*-Arten höchstens in der Breite, kaum aber in der absoluten Lage des pH-Optimums der Plasmalemma-ATPase zu differenzieren.

Ein Vergleich der in den hier untersuchten Arten vorgefundenen Substratspezifität der nativen Plasmalemma-ATPase mit der Literatur zeigt, daß das Ausmaß der Spezifität in diesen nativen Membranen nicht mit der Breite des pH-Optimums korreliert, wie dies von Sommarin et al. (1985) bei *Triticum* und *Avena* beobachtet wurde. Die Spezifität ist ebenso hoch, wie es von *Vigna radiata* (Yoshida et al. 1986a), *Phaseolus mungo* (Kasamo 1986), *Triticum aestivum* (Sommarin et al. 1985) und *Rosa damascena* (Imbrie und Murphy 1984) berichtet wurde. In Präparationen von *Neurospora crassa* (Bowman et al. 1981), *Raphanus sativus* (Cocucci und Marre 1984), *Avena sativa* (Sommarin et al. 1985) und *Plantago major*

ssp. *pleiosperma* (Staal et al. 1987) wurden höhere Spezifitäten gefunden. Dies ist aber offenbar nicht vom experimentellen Ansatz abhängig, da Sommarin et al. (1985) das Plasmalemma aus *Avena* und *Triticum* mit identischer Methode isolierten. Die Höhe möglicher Kontamination oder die Höhe der Spezifität des Enzyms scheint vielmehr von der untersuchten Art abhängig zu sein. Festzuhalten bleibt in diesem Zusammenhang jedoch, daß in allen Fällen, in denen das Enzym aus der Membran gelöst und weiter aufgereinigt wurde, die Nebenaktivität mit anderen Trinukleotiden 10 % nicht überschritt.

Die Untersuchung des Einflusses zweiwertiger Kationen auf die ATPase-Aktivität in sauberem Plasmalemma zeigt, daß in den von Kuiper und Kuiper (1979 a,b) studierten "crude microsomes" neben Plasmalemma noch weitere Membranen vorlagen, die eine CaATPase-Aktivität enthielten. Diese Autoren berichten nämlich von gleich hohen Aktivitäten in Gegenwart von Mg^{2+} und Ca^{2+} .

Zwischen den vier untersuchten Arten konnten zwar quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede in der Reaktion der Plasmalemma-ATPase auf zweiwertige Kationen festgestellt werden. Insbesondere schwankte die Basisaktivität in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen zwischen den verschiedenen Präparationen. Dies ist zum Teil auf adsorbierte unspezifische Phosphatase zurückzuführen, die als Substrat keinen Komplex in einer definierten geometrischen Anordnung benötigt und in unterschiedlichem Ausmaß in den Präparationen auftreten kann.

Mg^{2+} und ATP^{4-} bilden in wäßrigen Lösungen eine Reihe von Komplexen miteinander (Storer und Cornish-Bowden 1976). Wegen der bei niedrigem pH und niedriger Mg^{2+} - und ATP-Konzentration besonders starken Dissoziation der Mg-ATP-Komplexe war es unbedingt notwendig, die aktuelle Konzentration der vorliegenden Komplexe für kinetische Untersuchungen zu berechnen. Hierzu wurde die in Kap.3.8. dargestellte Formel entwickelt. Unter den hier gewählten Testbedingungen (pH 6.1, äquimolare Mengen von je 0.9 mM Mg^{2+} und ATP^{4-}) liegen ca. 50 % des ATP als $MgATP^{2-}$ -Komplex vor. Weitere 35 % sind freies $HATP^{3-}$. Der Rest verteilt sich auf die Spezies ATP^{4-} und $MgHATP^{-}$ (vgl. Kap.3.8.). Getrennte kinetische Analysen ergaben, daß der 1:1-Komplex $MgATP^{2-}$ wahrscheinlich das tatsächliche Substrat für die Reaktion darstellt (Serrano 1984a). Eine

mögliche Struktur dieses Komplexes in wäßriger Lösung ist in Abb.27 dargestellt.

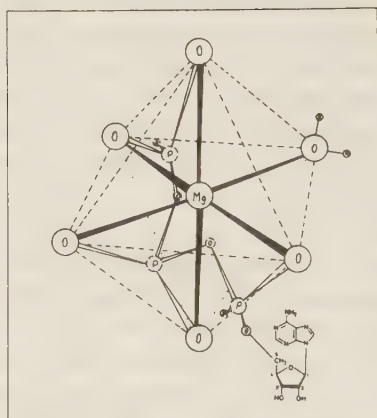


Abb.27: Modell für die Struktur des MgATP^{2-} -Komplexes mit einem koordinierten H_2O .

Die Fähigkeit eines zweiwertigen Kations, mit ATP^{4-} das für die Reaktion geeignete Substrat zu bilden, hängt von zwei wesentlichen Parametern ab: zum einen muß der Ionenradius "stimmen", d.h. die Geometrie des entstehenden Komplexes muß in das aktive Zentrum des Enzyms passen. Vergleicht man die Ionenradien der untersuchten Metallionen, so stellt man fest, daß Mg^{2+} (0.65 Å), Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} (alle etwa 0.68 bis 0.78 Å) ähnliche Ionenradien aufweisen, während Ca^{2+} (0.94 Å), Sr^{2+} (1.10 Å) und Ba^{2+} (1.29 Å) deutlich größer sind (alle Daten aus Schmidt 1969). Allein dieser Effekt kann somit schon erklären, warum die anderen Erdalkalimetalle Mg^{2+} für die ATPase-Reaktion nicht ersetzen können. Der zweite wichtige Parameter ist die Komplexbildungskonstante. Diese darf gegenüber dem Mg-Komplex weder zu hoch noch zu niedrig sein. Ist der Komplex wesentlich stabiler als der Mg-Komplex, so kann die Hydrolyse bzw. die Abtrennung des P_i vom entstandenen ADP erschwert sein. Ist er wesentlich instab-

biler, so kann es bei Annäherung des Komplexes an das Protein dazu kommen, daß das Zentralion von negativ geladenen Carboxylgruppen des Proteins aus dem ATP-Komplex "weggefangen" wird (s. auch den Effekt von Citrat auf die ATPase-Aktivität, Kap.5.1.5.). Gerade bei den Übergangsmetallen bestimmt neben dem (sehr ähnlichen) Ionenradius die Elektronenkonfiguration ganz entscheidend die Komplexstabilität. Als Beispiel seien Literaturwerte für Komplexbildungskonstanten der ATP-Komplexe einiger zweiwertiger Kationen genannt: Mg^{2+} : 10^{4-20} , Ca^{2+} : 10^{3-74} , Sr^{2+} : 10^{3-48} , Ba^{2+} : 10^{3-12} , Mn^{2+} : 10^{4-63} , Zn^{2+} : 10^{4-71} , Co^{2+} : 10^{4-88} , Ni^{2+} : 10^{4-90} , Cu^{2+} : 10^{5-97} (Khan und Martell 1966, alle Werte in M). Diese Stabilitätskonstanten weichen trotz sehr ähnlicher Ionenradien zum Teil deutlich voneinander ab. Alle Komplexe mit Bildungskonstanten unter 10^4 und über 10^{4-43} sind weniger effizient als der Mg-Komplex. Auch Zn^{2+} ergibt mit 10^{4-71} noch eine deutliche ATPase-Aktivität. Der stark inhibierende Effekt von Cu^{2+} auch auf die Basisaktivität ohne zweiwertige Kationen resultiert neben der hohen Stabilität des ATP-Komplexes aus der Ausbildung kovalenter Bindungen mit essentiellen HS-Gruppen, ähnlich der inhibierenden Wirkung von Hg^{2+} in allen biologischen Systemen. Das Ergebnis, daß Mg^{2+} für die ATPase-Aktivität essentiell ist und nur durch Co^{2+} , Mn^{2+} und bis zu einem gewissen Grad Zn^{2+} ersetzt werden kann, entspricht den Literaturangaben von Serrano (1984a).

Bei der Untersuchung der Kationenstimulation der ATPase-Aktivität hatte sich gezeigt, daß der stimulierende Effekt von K^+ auf den Bereich um pH 6 begrenzt ist. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit dieses Effektes wurde von O'Neill und Spanswick (1984a) für die Plasmalemma-ATPase aus *Beta vulgaris* beschrieben. Die Autoren fanden eine Verdoppelung der Aktivität bei pH 6,0, während in der Nähe des für diese Art gefundenen Aktivitätsmaximums von pH 7,0 keine Stimulation mehr zu beobachten war.

Im Vergleich zu Literaturangaben sind hinsichtlich der Kationenstimulation (Abb.20 und Tab.14) drei Punkte hervorzuheben: im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lerner et al. (1983) an *Pisum sativum* führt eine Erhöhung der Salzkonzentration über 50 mM hinaus nicht zu einer Abnahme, sondern zu einer weiteren Stimulation. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, daß im Unterschied zu den von Vara und Serrano (1982) und Bowman et al. (1981) publizierten

Daten Na^+ und K^+ in den meisten Fällen etwa denselben Effekt haben. In den zitierten Arbeiten lieferte Na^+ nur etwa die Hälfte der mit K^+ erzielten Stimulation. Auch Vara und Serrano (1982) berichten, daß Li^+ eine deutlich niedrigere Stimulation als K^+ erzeugt und Cs^+ etwa denselben Effekt wie K^+ hat. Die Effizienz der stimulierenden Wirkung hängt offenbar vom Ionenradius ab, da alle Ionen mit einem K^+ ähnlichen Radius (Cs^+ und NH_4^+) auch denselben Effekt auslösen. Die Ergebnisse stehen auch im Gegensatz zu der Arbeit von Braun et al. (1986). Diese Autoren konnten an Plasmalemmavesikeln aus Wurzeln des Halophyten *Atriplex nummularia* keine Stimulation der ATP-abhängigen Ausbildung eines elektrischen Gradienten durch K^+ oder Na^+ finden, wenn die Pflanzen in Nährmedium ohne Salzzusatz angezogen wurden.

Das Resultat, daß Na^+ und K^+ keine synergistische Wirkung auf die Plasmalemma-ATPase ausüben, steht im Widerspruch zu den von Vakhmistrov et al. (1982) und Wingstrand (1985) publizierten Ergebnissen. In Kombination mit der Insensitivität des Enzyms aus *P. maritima* gegenüber Ouabain (Kap.4.2.2.3.) beweist der Versuch, daß beide Arten keine ATPase enthalten, die der tierischen Na/K -ATPase strukturell nahesteht. Der Unterschied zu den zitierten Ergebnissen resultiert meiner Ansicht nach daraus, daß in den von mir untersuchten Präparationen sauberes Plasmalemma vorlag. Die Arbeit von Vakhmistrov et al. (1982) geht von aus Dichtegradienten geernteten Membranen aus, deren Reinheit nicht überprüft wurde. Wingstrand (1985) untersuchte Plasmalemma aus jungen Wurzeln der Zuckerrübe, das er mit einem Zweiphasensystem isoliert hatte. Diese Präparation, in der er wie Vakhmistrov et al. (1982) einen kooperativen Effekt von K^+ und Na^+ feststellte, zeigte deutliche Inhibition der ATPase durch alle getesteten Inhibitoren. Seine Präparation war daher mit einer Reihe anderer Membranen verunreinigt.

Über den molekularen Mechanismus der K^+ -Stimulation existiert z.Zt. die folgende Theorie (Briskin 1986): Die ATPase-Reaktion verläuft in 3 Schritten: Zunächst phosphoryliert ATP eine Aspartat-Carboxylgruppe, anschließend kommt es zu einer Konformationsänderung des phosphorylierten Proteins, und schließlich wird die Aspartat-Carboxylgruppe dephosphoryliert. Wie hierbei Protonen gepumpt werden, ist noch offen, doch ist es denkbar, daß der Protonentransport an die Konformationsänderung gebunden ist. K^+

könnte sowohl den zweiten, als auch den dritten Schritt positiv beeinflussen, sei es durch Strukturänderung des Proteins oder durch Ladungsausgleich am abdissoziierenden Phosphat. Erste Untersuchungen Briskins an den Reaktionsintermediaten deuten darauf hin, daß K^+ den dritten Schritt katalysiert. Dies entspräche dem von der tierischen Na/K-ATPase bekannten Reaktionsmuster in Hinblick auf den letzten Schritt der Reaktion (Cantley 1981). Ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Enzymen besteht allerdings darin, daß nach den gezeigten Ergebnissen Na^+ fast denselben Effekt auf die Plasmalemma-ATPase hat. Eine für K^+ spezifische Bindungsstelle existiert demnach vermutlich nicht. Die tierische Na/K-ATPase weist dagegen eine derartige Bindungsstelle auf, die durch Ouabain kompetitiv besetzt werden kann (Buddecke 1984). Wie bei den Inhibitorstudien gezeigt (Kap.4.2.3.), hat dieses Glykosid keinen Einfluß auf die Plasmalemma-ATPase.

Die in den kinetischen Analysen erhaltenen K_m -Werte liegen um eine Zehnerpotenz über den für die lösliche Phosphatase ermittelten (s.Kap.4.1.) und auch deutlich über den für Tonoplasten-ATPase gemessenen Michaelis-Konstanten (0.1 - 0.2 mM, Sze 1985). Für Mitochondrien gibt Sze (1985) einen K_m -Wert von 0.8 mM an. Größere Kontaminationen durch andere membran gebundene Phosphatasen können auch auf Grund dieser Daten ausgeschlossen werden. Eine gewisse Ungenauigkeit bei der Berechnung der K_m -Werte ergibt sich aus mathematischen Gründen: die berechneten $MgATP^{2-}$ -Konzentrationen weisen im niedrigsten Konzentrationsbereich die größte Unsicherheit auf, da der Komplex hier am stärksten dissoziiert ist und der relative Einfluß von Fremdionen wie MES^- und Cl^- hier am größten wird. Die beobachteten geringen Unterschiede zwischen den Arten werden aus diesem Grund als nicht signifikant angesehen. Insbesondere ist festzuhalten, daß es keine mit der Salztoleranz korrelierenden Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften zwischen den salztoleranten *Plantago*-Arten einerseits und den salzsensitiven Arten andererseits gibt. Auch dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Arbeit von Braun et al. (1986), die in *Atriplex nummularia* unter salzfreien Anzuchtbedingungen keine Michaelis-Menten-Kinetik der ATP-abhängigen Erzeugung eines elektrischen Potentials in Plasmalemmavesikeln beobachten konnten.

Die beobachtete Erhöhung der Maximalaktivität mit verbesserter

Nährstoffversorgung in *P.lanceolata* und *P.maritima* korreliert mit Beobachtungen von Kuiper und Staal (1986) an *P.major* ssp. *major*. Ihren Untersuchungen zu Folge wird v_{max} der MgATPase-Aktivität von "crude microsomes" aus Wurzeln durch unterschiedliche Belichtung der Pflanzen um einen Faktor bis zu vier moduliert. Offenbar haben die Wachstumsbedingungen einen starken Einfluß auf die spezifische Aktivität der MgATPase von Plasmamembranen in Pflanzen.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die größten Unterschiede zwischen den Plasmalemma-ATPasen aus den sechs untersuchten *Plantago*-Arten in der Breite des pH-Optimums und in der Höhe der maximalen spezifischen Aktivität von *P.crassifolia* liegen. Alle anderen analysierten Parameter, d.h. Substratspezifität, Stimulation durch ein- und zweiwertige Kationen, Inhibition durch Vanadat und DCCD, sind in allen Arten unter nicht-salinen Anzuchtbedingungen sehr ähnlich. Bei der Diskussion der pH-Abhängigkeit der Aktivität wurde schon darauf hingewiesen, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine Verbreiterung des pH-Optimums nicht eine Eigenschaft der ATPase selber ist, sondern durch adsorbierte unspezifische Phosphatase verursacht sein kann. Dieser Frage kann nur nach Solubilisation und weiterer Aufreinigung des Enzyms nachgegangen werden.

Im Gegensatz zu den von Braun et al. (1986) beschriebenen Eigenschaften der Plasmalemma-ATPase des Halophyten *Atriplex nummularia* unter nicht-salinen Bedingungen entwickeln die von mir untersuchten Halophyten *P.maritima*, *P.coronopus* und *P.crassifolia* enzymatische Eigenschaften, die sich nicht grundsätzlich von denen der glykophytischen Arten unterscheiden. Die bisherigen Ergebnisse legen deshalb den Schluß nahe, daß es sich innerhalb der Gattung *Plantago* bei der Plasmalemma-ATPase um ein konservatives Enzym handelt, das weder von Halophyt zu Glykophyt noch innerhalb einer Art von Wurzel zu Blatt in signifikantem Ausmaß variiert. Untersuchungen darüber, ob saline Anzuchtbedingungen einen Einfluß auf qualitative oder quantitative Eigenschaften des Enzyms haben, werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

5.2. Charakterisierung der nativen Plasmalemma-ATPase unter salinen Kulturbedingungen

Die Untersuchungen an unterschiedlich salztoleranten *Plantago*-Arten unter nicht-salinen Kulturbedingungen hatten gezeigt, daß sich diese Arten hinsichtlich plasmalemma-gebundener ATPasen nicht wesentlich unterscheiden. Saline Wachstumsbedingungen beeinflussen die Lipidzusammensetzung von "crude microsomes" aus *Plantago* (Erdei et al. 1980) und von Plasmalemma aus Citrus-Arten (Douglas 1985). Wegen der Wechselwirkungen zwischen Membranlipiden und membrangebundenen Proteinen können solche Änderungen auch Einfluß auf biochemische Eigenschaften der ATPase haben. Darüberhinaus ist es denkbar, daß in den salztoleranten *Plantago*-Spezies erst durch saline Umweltbedingungen die Bildung zusätzlicher Transport-ATPasen induziert wird. Braun et al. (1986) fanden drastische Unterschiede in den Eigenschaften von Plasmalemma-ATPase aus dem Halophyten *Atriplex nummularia*, wenn die Pflanzen salinen Anzuchtbedingungen ausgesetzt waren. Da sich die Ionentransporteigenschaften von *Plantago maritima*-Wurzeln unter salinen Anzuchtbedingungen ebenfalls deutlich ändern (DeBoer 1985) war es notwendig, die Eigenschaften der Plasmalemma-ATPase der halophytischen *Plantago*-Arten auch unter salinen Bedingungen zu studieren.

5.2.1. Der Einfluß von salinen Kulturbedingungen auf den physiologischen Zustand von *Plantago crassifolia*

Plantago maritima und *P. coronopus* werden durch den Zusatz von 100 bis 200 mM NaCl zum Kulturmedium in einen gegenüber den Kontrollen geänderten physiologischen Zustand versetzt (Ahmad et al. 1979, Erdei und Kuiper 1979a, Gorham et al. 1981). Das Na/K-Verhältnis im Sproß ändert sich drastisch, d.h. die Pflanzen akkumulieren hohe Na-Mengen (bis zu 5 mmol Na⁺ / g Trockengewicht in *P. maritima*), und sie reichern als cytoplasmatisches Osmotikum den Polyalkohol Sorbitol an. Dieser kann durch die NADPH-abhängige Aldose-6-Phosphat-Reduktase aus Glucose oder durch die NADH-abhängige L-Iditol-Dehydrogenase aus Fructose gebildet werden (Michal 1982, Negm und Loescher 1981).

Entsprechende Daten lagen für *P. crassifolia* nicht vor. Zunächst

war daher zu überprüfen, ob die sechswöchige Kultur bei 150 mM NaCl ausreichte, den Wasser- und Mineralstoffhaushalt dieser Art ebenfalls in der beschriebenen Weise zu ändern. Das erste Ergebnis der Salzbehandlung war die Beobachtung, daß die Pflanzen nicht sichtbar hinter den Kontrollen im Wachstum zurückblieben, obwohl ihre Transpiration auf etwa 15 - 20 % des Wertes der Kontrollen herabsank. Dies wurde anhand der Wassermenge festgestellt, die den Kulturlösungen zum Ausgleich des durch Transpiration verlorenen Wassers zugesetzt wurde. Die gaschromatographische Analyse der löslichen Kohlenhydrate und Polyole zeigte sowohl in den Kontrollen als auch in den salzbehandelten Proben nur einen Hauptpeak, dessen Retentionszeit mit derjenigen von authentischem Sorbitol übereinstimmte (Abb.28).

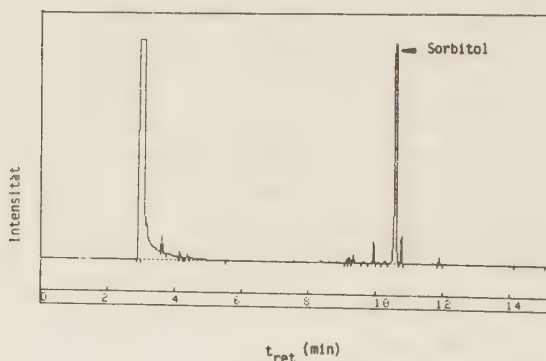


Abb.28: Gaschromatogramme der löslichen Kohlenhydrate und Polyole aus Wurzeln von salzbehandelten *P.crassifolia*.

Die massenspektroskopische Analyse bestätigte, daß es sich hierbei tatsächlich um Sorbitol handelte (Abb.29), da die Massenspektren des Hauptpeaks aus den salzbehandelten Pflanzen und des Sorbitol-Hexa-Trimethylsilyl-Derivats identisch waren.

Eine Zusammenfassung der Ionen-, Sorbitol- und Wassergehalte der Kontroll- und der salzbehandelten Pflanzen ist in Tab.16 gegeben.

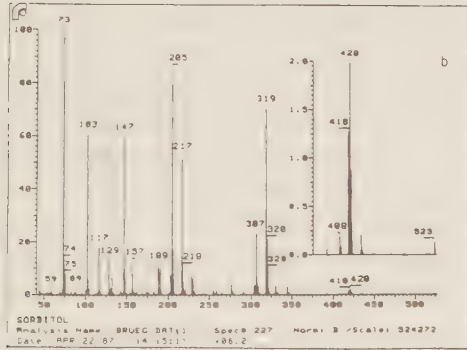
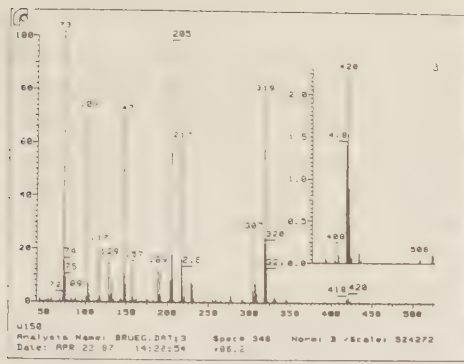


Abb.29: Massenspektren des Hauptpeaks aus Abb.28 (a) und von Sorbitol-Hexa-TMS (b).

Tab.16: Einfluß von 150 mM NaCl im Kulturmedium auf den Wasser-, Ionen- und Sorbitolgehalt von *Plantago crassifolia*

Probe	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Sorbitol	H ₂ O
Kontrolle					
Blätter	78	155	137	70	88.6
Wurzeln	25	58	-	50	92.4
150 mM NaCl					
Blätter	328	34	214	86	91.1
Wurzeln	94	44	-	71	93.2

Folgende Einheiten wurden benutzt: Na⁺, K⁺ und Cl⁻: mmol/kg Frischgewicht; Sorbitol: % Peakfläche aller löslichen Kohlenhydrate und Polyole; H₂O: % Frischgewicht

Diese Daten zeigen zwei wichtige Aspekte auf. Zum einen enthalten nicht nur die salzbehandelten, sondern auch die Kontrollpflanzen einen sehr hohen Anteil an Sorbitol in der Fraktion der löslichen

Kohlenhydrate und Polyole. Da die Kulturbedingungen im Gewächshaus für diese Art mit einer technisch bedingten Luftfeuchtigkeit von 30 - 40 % vermutlich nicht optimal war, ist es möglich, daß Sorbitol von dieser Art allgemein als Streßmetabolit gebildet wird, sobald auch nur zeitweilig durch starke Transpiration ein leichtes Wasserdefizit im Sproß auftritt.

Der zweite Aspekt betrifft das Na/K-Verhältnis. Die Kontrollpflanzen weisen mit 0.50:1 in den Blättern und 0.43:1 in den Wurzeln hohe relative Na-Gehalte auf. Diese Quotienten entsprechen fast exakt demjenigen der Nährlösung (0.8 mM Na⁺/1.8 mM K⁺, Na/K-Verhältnis 0.44:1). *P. crassifolia* akkumuliert also unter den experimentellen Nährstoffbedingungen jedes verfügbare Kation. Zum Vergleich wurden auch von anderen *Plantago*-Arten die molaren Na/K-Verhältnisse unter Kontrollbedingungen ermittelt. Dabei ergab der Halophyt *P. coronopus* einen Na/K-Quotienten im Sproß von 0.42:1, während die Glykophyten *P. lanceolata* und *P. major* ssp. *pleiosperma* Verhältnisse von 0.26:1 bzw. 0.20:1 zeigen. Im Gegensatz zu den Halophyten schließen diese Arten also Na⁺ im Verhältnis zu K⁺ bei der Kationenaufnahme aus.

Unter salinen Bedingungen weist die Wurzel etwa dieselbe Molartät an monovalenten Kationen wie das Medium auf (Na⁺ + K⁺ = 148 mM, bezogen auf das enthaltene Wasser), doch ist das Na/K-Verhältnis von 84:1 im Medium auf 2.1:1 reduziert worden. Im Unterschied zu den Kontrollbedingungen findet also unter salinen Kulturbedingungen eine relative K⁺-Anreicherung in der Wurzel statt. Im Sproß findet sich unter diesen Bedingungen mit 10:1 ein höheres Na/K-Verhältnis als in der Wurzel. Dies zeigt an, daß das aufgenommene Na⁺ überwiegend in den Sproß transloziert wird. *P. crassifolia* reagiert also wie *P. maritima* und *P. coronopus* auf die salinen Kulturbedingungen mit einem geänderten Ionentransportverhalten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

5.2.2. Reinheit der Plasmalemma-Vesikel aus Wurzeln salzbehandelter *P. maritima*

Wichtig für die Interpretation der an salzbehandelten Pflanzen gewonnenen Ergebnisse ist die Frage, ob sich durch die veränderten Kulturbedingungen und die damit einhergehenden Änderungen der

Lipidzusammensetzung der Membranen (Erdei et al. 1980, Douglas 1985) auch die Reinheit der mit dem Zweiphasensystem isolierten Plasmalemmavesikel ändert. Deshalb wurde der Effekt von Phosphatase-Inhibitoren auf plasmalemmagebundene ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten (200 mM NaCl) *P.maritima* untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tab.17: Effekt von Phosphatase-Inhibitoren auf native Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten (200 mM NaCl) *P.maritima*

Inhibitor	ATPase (% der Kontrolle)
ohne	100
KNO ₃ (45 mM)	120
Na ₂ VO ₄ (100 µM)	24
Na ₂ MoO ₄ (100 µM)	92
NaN ₃ (1 mM)	96
DCCD (100 µM)	46
Oligomycin (10 µg/ml)	110
Quabain (10 µM)	116

Wie in den Kontrollpflanzen (Kapitel 4.2.3.) wirken nur Vanadat und DCCD hemmend auf die ATPase. Kontamination durch Tonoplasten und Mitochondrien können daher weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Erhöhung der Osmolarität der beim Aufschluß verwendeten Puffer durch den Einsatz von 400 mM Saccharose unter Beibehaltung aller anderen Parameter reicht also aus, um auch in den salzbehandelten Pflanzen eine hinreichende Reinheit der Präparation zu garantieren. Die unter nicht-salinen Kulturbedingungen analysierten Eigenschaften der ATPase (pH-Optimum, Kinetik, Substratspezifität und Salzstimulation) konnten daher auch an salzbehandelten Pflanzen studiert werden.

5.2.3. pH-Abhängigkeit der Plasmalemma-ATPase

Die pH-Optima der ATPase aus Wurzel-Plasmalemma wurden an salzbehandelten *P.maritima* (200 mM NaCl) und *P.crassifolia* (150 mM NaCl) untersucht. Bei *P.maritima* wurde außerdem die ATPase aus Blattpräparationen von Kontroll- und salzbehandelten (100 mM NaCl) Pflanzen analysiert (Abb.30a,b u.31).

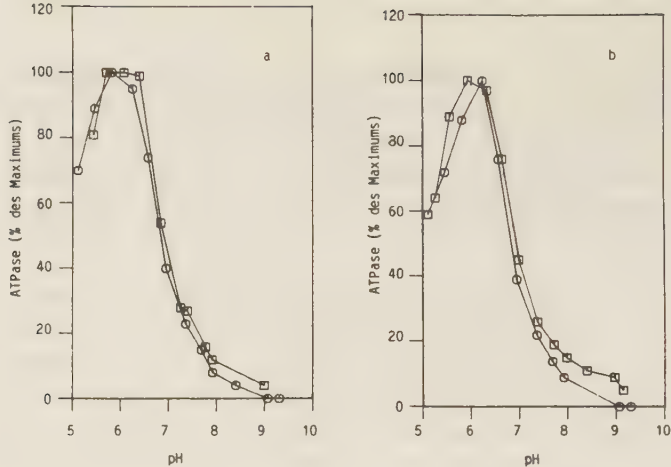


Abb.30: pH-Abhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus a: Wurzeln und b: Blättern von *P.maritima*. (○) Kontrollen, (□) salzbehandelte Pflanzen.

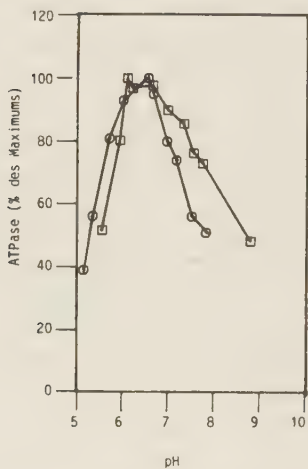


Abb.31: pH-Abhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.crassifolia*. (○) Kontrollen, (□) salzbehandelte Pflanzen

Während die ATPase-Aktivität aus *P.maritima* unter allen untersuchten Kulturbedingungen (0, 100 und 200 mM NaCl) scharfe pH-Optima bei pH 6.2 zeigt, weist die Aktivität aus *P.crassifolia* unter beiden Bedingungen breite Optima um pH 6.5 auf. Die spezi-

fischen Aktivitäten änderten sich bei beiden Arten um weniger als 10 %, solange die Pflanzen in gleich konzentrierten Nährlösungen angezogen wurden, die sich nur im NaCl-Gehalt unterschieden.

Bei *P. crassifolia* war eine leichte Verschiebung der Aktivität zu etwas höheren Werten im neutralen und alkalischen pH-Bereich festzustellen. Die Lage des Maximums selber änderte sich nicht.

Die Änderung der Kulturbedingungen führt nach den hier vorgestellten Ergebnissen zwar zu Verschiebungen im Wasser- und Ionenhaushalt der untersuchten Arten, hat aber keine signifikanten Auswirkungen auf das pH-Optimum der Plasmalemma-ATPase zur Folge.

5.2.4. Substratspezifität

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Beurteilung von Veränderungen der membrangebundenen ATPase-Aktivität unter salinen Bedingungen ist die Substratspezifität. Diese ändert sich unter salinen Anzuchtbedingungen (100 mM NaCl) bei nativen Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P. maritima* nicht (Tab.18) und ergibt damit vergleichbare Eigenschaften wie in dem Enzym aus Kontrollpflanzen.

Tab.18: Substratspezifität der nativen Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten *P. maritima* (100 mM NaCl):

Substrat (0.9 mM)	Phosphatase (% der Kontrolle mit ATP)
ATP	100
ATP/ VO_4^{3-}	56
ADP	9
AMP	7
GTP	18
CTP	0
UTP	12
ITP	32
PP_i	22
PNPP	32

Die zweite Zeile zeigt die Akt.in Ggw. von 50 μM Na_2VO_4 .

Wie aus der Tabelle ebenfalls ersichtlich ist, bleibt die Sensitivität des Enzyms gegenüber Vanadat auch unter den geänderten Kulturbedingungen erhalten (siehe auch 5.2.2.). Die bis maximal

32 %ige unspezifische Aktivität mit anderen Substraten als ATP zeigt, daß gegenüber den Präparationen aus Kontrollpflanzen in dieser Art die mögliche Kontamination mit unspezifischer Phosphatase nicht größer geworden ist.

5.2.5. Reaktionskinetik der ATPase

Die Reaktionskinetik der nativen Plasmalemma-ATPase wurde an Wurzeln von *P. maritima* untersucht (Abb.32).

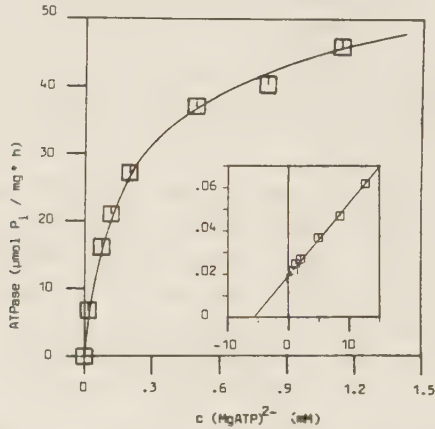


Abb.32: Konzentrationsabhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten (200 mM NaCl) *P. maritima*. Kleine Abb.: Lineweaver-Burk-Plot.

Wie bei den Kontrollpflanzen (Kap.5.1.4.) wurde auch bei den unter 200 mM NaCl angezogenen Pflanzen eine Sättigungskinetik mit einer K_m von 0.18 mM MgATP^{2-} und einer v_{max} von 52 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{h}$ gefunden. Während die Michaelis-Konstante etwas niedriger als bei den ohne Salz angezogenen Pflanzen liegt (Kap.5.1.4.), sind die Maximalaktivitäten sehr ähnlich.

5.2.6. Salzstimulation der ATPase

Da sich unter salinen Bedingungen das Ionenmilieu in Zellwand, Vakuole und möglicherweise auch im Cytoplasma drastisch ändern kann, war es wichtig, die Salzstimulation des Enzyms auch unter

salinen Anzuchtbedingungen zu studieren. Diese Untersuchungen wurden an *P.coronopus* und *P.maritima* durchgeführt. Abb.33 zeigt am Beispiel von Wurzeln aus *P.coronopus*, daß KCl und NaCl auch bei salzbehandelten Pflanzen die ATPase um 100 bis 140% stimulieren. Der gleiche Stimulationseffekt konnte in Wurzeln von *P.maritima* beobachtet werden, wenn die Pflanzen bei 100 oder 200 mM NaCl im Kulturmedium gehalten wurden (Abb.34).

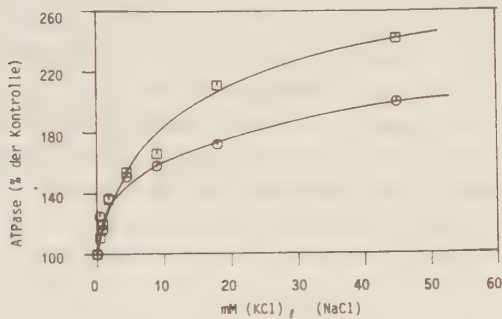


Abb.33: Stimulation der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten (75 mM NaCl) *P.coronopus* durch (□) KCl und (○) NaCl

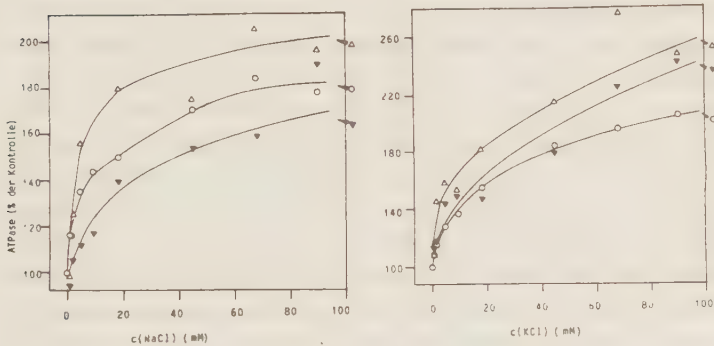


Abb.34: Stimulation der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.maritima* durch KCl und NaCl. (○): Kontrollen, (Δ): 100 mM NaCl im Anzuchtmedium, (▼): 200 mM NaCl im Anzuchtmedium.

Ebenso wie die anderen untersuchten Parameter bleibt also auch diese Eigenschaft der Plasmalemma-ATPase trotz geänderter Anzuchtbedingungen konstant.

5.2.7. Diskussion

Die Untersuchungen der Ionen- und Sorbitolgehalte in *P. crassifolia* haben gezeigt, daß diese Art sehr ähnlich wie *P. maritima* und *P. coronopus* reagiert. Die beobachtete relativ hohe Na^+ -Aufnahme im Verhältnis zu den Glykophyten *P. major* ssp. *pleiosperma* und *P. lanceolata* unter Kontrollbedingungen entspricht den Resultaten, die DeBoer (1985) an *P. media* und *P. maritima* erhielt. Unter salinen Kulturbedingungen zeigt *P. crassifolia* ebenfalls eine ähnliche Reaktion wie *P. maritima*, indem die Art die Na^+ -Konzentration in der Wurzel niedriger als im Außenmedium hält, ohne die K^+ -Aufnahme einzuschränken. Das aufgenommene Na^+ wird dagegen wie in *P. maritima* in den Sproß transloziert (Ahmad et al. 1978, DeBoer 1985).

Die Produktion von Sorbitol in Blatt und Wurzel auch unter nicht-salinen Kulturbedingungen wurde von Ahmad et al. (1979) an *P. maritima* nicht beobachtet. P. Kuiper (U Groningen, pers.Mitt.) fand jedoch auch in dieser Art unter nicht-salinen Bedingungen Sorbitol. Ahmad et al. (1978) machen über ihre Kulturbedingungen keine näheren Angaben. Es ist möglich, daß ihre Pflanzen unter höherer Luftfeuchtigkeit angezogen wurden als die in dieser Arbeit verwendeten *P. crassifolia*. Die Bildung von Sorbitol als Reaktion schon auf relativ kleine Wasserdefizite durch niedrige Luftfeuchtigkeit würde das unterschiedliche Verhalten der Pflanzen in den Experimenten von Ahmad et al. (1978), Kuiper (pers.Mitt.) und dieser Arbeit erklären. Eine andere Erklärung für die hohen relativen Sorbitolgehalte besteht darin, daß *P. crassifolia* dieses Polyol möglicherweise als Hauptphotosyntheseprodukt bildet, wie Loescher et al. (1982) es für *Malus domestica* zeigen konnten. In dieser Pflanze macht Sorbitol ca. 70 % der löslichen Kohlenhydrate und Polyole aus. Gleichzeitig stellt der Polyalkohol die Form dar, in der reduzierter Kohlenstoff im Frühjahr vom Stamm in die Blätter und während des Sommers von den Blättern in den Stamm transportiert wird.

Während die Ionenkonzentrationen in Sproß und Wurzel deutlich auf die geänderten Salzverhältnisse reagieren und damit anzeigen, daß sich das Ionentransportverhalten in der für Halophyten typischen

Weise geändert hat, sind bei den biochemischen Eigenschaften der ATPase keine signifikanten Veränderungen festzustellen. So bleibt die pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in Plasmalemma aus Blättern und Wurzeln von *P.maritima* auch unter salinen Anzuchtbedingungen konstant. Auf eine mögliche Erklärung der leichten Verschiebung der ATPase-Aktivität zu etwas neutraleren pH-Werten durch die Salzbehandlung in Wurzeln von *P.crassifolia* wies P.Kuiper (Universität Groningen, pers.Mitt.) hin. Die ATPase-Aktivität ist stark vom umgebenden Lipidmilieu - und zwar insbesondere von Wechselwirkungen mit Phospholipiden (Cocucci und Marre 1984) - abhängig. Aus mehreren Arbeiten geht hervor, daß salines Wurzelmilieu die Lipidzusammensetzung des Plasmalemmas bei *Plantago*- und *Citrus*-Arten ändert (Erdei et al. 1980, Douglas 1985). Daher ist es durchaus möglich, daß die beobachtete andere Form des pH-Optimums auf veränderte Lipid-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Inwieweit solche Überlegungen auch für *P.maritima* Gültigkeit haben können, bleibt zunächst offen. Erdei et al. (1980) zeigten unterschiedliche Effekte von salinen Anzuchtbedingungen auf Membranlipide in *P.maritima* und *P.coronopus*: während die erste Art mit einem leichten Anstieg von Sterolen und Sulfolipiden in "crude microsomes" reagierte, sanken bei *P.coronopus* die Sulfolipide deutlich ab. Die Reaktion der Pflanzen auf die Änderung der Salinität des Mediums kann hinsichtlich der Lipidzusammensetzung des Plasmalemmas also von Art zu Art verschieden sein.

Die von Comerford et al. (1985) beobachtete drastische Änderung der pH-Abhängigkeit der ATPase in Plasmalemmapräparationen der marinen Hefe *Debaryomyces hansenii* konnte in den *Plantago*-Arten nicht gefunden werden. Die Autoren beobachteten beim Übergang von salzfreiem Kulturmedium zu 1.5 M NaCl nicht nur eine Verdreifachung der spezifischen Aktivität, ohne daß sie den Nährstoffgehalt des Mediums erhöhten, sondern sie berichten auch vom Auftreten eines deutlichen zweiten Maximums bei pH 8.0.

Die Beobachtung, daß sich die spezifische Aktivität der Plasmalemma-ATPase durch saline Kulturbedingungen nicht wesentlich änderte, stimmt mit den Ergebnissen von Erdei et al. (1980) hinsichtlich der nur wenig sinkenden MgATPase-Aktivität in "crude microsomes" im Bereich bis zu 200 mM NaCl im Kulturmedium überein. Da diese Autoren aber gleich hohe CaATPase-Aktivität

fanden, konnten ihre Daten noch nicht auf die Plasmalemma-ATPase alleine bezogen werden. Durch die hier vorgelegten Messungen wird aber deutlich, daß dieses Enzym in *P.maritima* weder mit signifikanten Änderungen der pH-Abhängigkeit noch der kinetischen Daten reagiert. Die Beobachtung der niedrigeren Michaelis-Konstante unter salinen Kulturbedingungen ist meines Erachtens ohne Bedeutung für die Adaptation der Pflanzen an den Salzgehalt der Nährlösung und wird an anderer Stelle diskutiert.

Auch die Stimulation der ATPase-Aktivität durch einwertige Kationen änderte sich unter salinen Anzuchtbedingungen nicht. Braun et al. (1986) fanden dagegen eine Stimulation der ATP-abhängigen Erzeugung eines elektrischen Gradienten in Plasmalemma-vesikeln aus *Atriplex nummularia* durch K^+ ausschließlich in Pflanzen, die bei 400 mM NaCl kultiviert wurden. Erneut konnten die an *A.nummularia* erhaltenen Befunde dieser Arbeitsgruppe an den beiden *Plantago*-Arten *maritima* und *coronopus* nicht bestätigt werden.

6. Untersuchungen an solubilisierten ATPasen

Elektrophoretische Untersuchungen an möglichst reinen ATPase-Präparationen sollten Aufschluß darüber geben, ob sich die Enzyme aus den verschiedenen Arten im Molekulargewicht unterscheiden und ob sich durch saline Kulturbedingungen Änderungen im Proteinmuster dieser Präparationen ergeben. Gleichzeitig galt es festzustellen, ob die Phosphatase-Aktivität mit anderen Nukleotiden als ATP eine Eigenschaft des Enzyms ist, oder auf Kontaminationen beruht. Hierzu erwies es sich als notwendig, die ATPase in aktiver Form aus den Membranen zu lösen.

Membranassoziierte Proteine lassen sich nach Maddy und Dunn (1976) in drei Gruppen einteilen:

Eine erste Klasse von Proteinen zeigt im wesentlichen hydrophile Eigenschaften und ist nur durch schwache hydrophobe oder elektrostatische Kräfte an Membranen gebunden. Diese Proteine dissoziieren häufig schon unter den Salzbedingungen der Aufschlußpuffern von der Membran ab, treten also in den isolierten Membranfraktionen gar nicht mehr auf. Sie sind aber unter *in vivo* Bedingungen unerlässlich für die komplette biologische Funktion der Membran.

Zweitens läßt sich eine Gruppe von Proteinen beschreiben, die relativ starke hydrophobe Wechselwirkung mit der Membran aufweist. Diese Proteine reichen in die Membran hinein, sind aber außerdem durch hydrophile Domänen gekennzeichnet, mit denen sie in Wechselwirkung mit dem wäßrigen Medium treten. Durch Verwendung hoher Salzkonzentrationen oder milder Detergenzien lassen sich diese Proteine aus den Membranen extrahieren.

Eine dritte Gruppe von sogenannten intrinsischen Membranproteinen ist im theoretischen Extremfall völlig in die Membran eingeschlossen, in der Praxis stehen diese Proteine jedoch meist noch in Kontakt zum wäßrigen Medium. Diese Proteine können nur unter Einsatz von Detergentien aus den Membranen gelöst werden, die nicht nur die hydrophoben Wechselwirkungen aufheben, sondern auch in der Lage sind, das Protein anschließend im wäßrigen Medium zu stabilisieren.

Da die Plasmalemma-ATPase, bedingt durch ihre Funktion als Proto-

nenpumpe, zu den intrinsischen Proteinen gehört, die unspezifische vakuoläre Phosphatase aber nur locker an das Plasmalemma assoziiert ist (Kaiser et al. 1986), ist es durch entsprechende Wahl von Salz- und Detergentienbehandlung möglich, die Phosphatase von der ATPase zu trennen. Untersuchungen zum Lösungsverhalten der ATPase aus Kulturpflanzen liegen von einigen Arbeitsgruppen vor (Anthon und Spanswick 1986, Cocucci et al. 1985, O'Neill und Spanswick 1984a, Vara und Serrano 1982). Die Vanadat-sensitive ATPase aus dem Plasmalemma der verschiedenen Arten läßt sich mit Octylglucosid, dem zwitterionischen Detergenz CHAPSO, Deoxycholat und Phospholipiden lösen. Phospholipide stimulieren darüberhinaus die Aktivität solubilisierter ATPase in der Reihenfolge Lysophosphatidylcholin, Sojabohnen-Phospholipide, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (Cocucci et al. 1985). Die unterschiedliche Effektivität der verschiedenen Phospholipide beruht möglicherweise auf der unterschiedlichen Struktur des Lipidanteils der in wäßriger Lösung formierten Vesikel (Brosius 1984).

Anthon und Spanswick (1986) arbeiteten eine schrittweise Wasch- und Solubilisationsmethode für die ATPase aus dem Plasmalemma von Tomatenwurzeln aus. In einem ersten Schritt werden mit KBr und TRITON X-100 locker adsorbierte Proteine von der Membran gelöst. Anschließend wird mit Octylglucosid und DOC ein großer Teil der intrinsischen Membranproteine extrahiert. Die noch in den Membranen verbliebene ATPase ließ sich dann durch Lysophosphatidylcholin solubilisieren, nachdem durch die Deoxycholat-Behandlung ein großer Teil der Phospholipide aus der Membran entfernt worden war. Die Löslichkeitseigenschaften der ATPase sind jedoch von Art zu Art verschieden, wie ein Vergleich der zitierten Arbeiten zeigt.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Anthon und Spanswick (1986) wurde in der vorgelegten Arbeit versucht, ebenfalls möglichst reine Plasmalemma-ATPase zu isolieren, um die biochemischen Eigenschaften außerhalb der nativen Membran zu studieren und elektrophoretische Analyse durchzuführen. Hinsichtlich der elektrophoretischen Untersuchung hatten Vorversuche an nativen Membranen zu einer Vielzahl von Proteinbanden geführt, deren Zuordnung zur ATPase-Aktivität nicht möglich war. Im Laufe der Experimente zeigte sich, daß innerhalb der Gattung *Plantago* das Löslichkeitsverhalten der Plasmalemma-ATPase unterschiedlich ist. Die Ergeb-

nisse werden daher im Folgenden nach den Arten getrennt dargestellt.

6.1. ATPase aus *P.coronopus*

Die Plasmalemma-ATPase aus Blättern und Wurzeln des Halophyten *P.coronopus* läßt sich bereits im zweiten Schritt des modifizierten Verfahrens nach Anthon und Spanswick (1986) durch Octylglucosid und Deoxycholat vollständig extrahieren. In der Lysophosphatidylcholin-Fraktion, also dem dritten Extraktionsschritt, konnte keine ATPase-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Die Eigenschaften der KBr/TRITON-löslichen, der Octylglucosid-DOC-löslichen und der unlöslichen Fraktion aus Plasmalemma aus Blättern sind in Abb.35 und 36 und Tab.19 dargestellt.

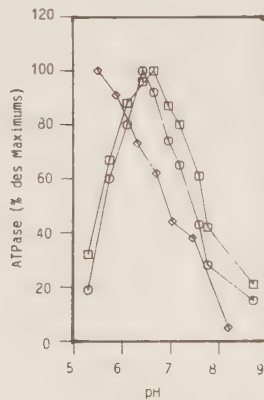


Abb.35: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in löslichen und unlöslichen Fraktionen aus Plasmalemma von *P.coronopus*-Wurzeln.
 (□): KBr/TRITON-lösliche Fraktion, (○): Octylglucosid/DOC-lösliche Fraktion, (◇): Lysophosphatidylcholin-unlösliche Fraktion

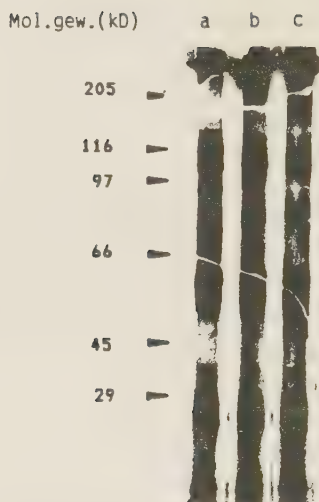


Abb.36: SDS-PAGE von Octylglucosid/DOC-löslichen Membranproteinen aus dem Plasmalemma von *P.coronopus*. a: Wurzeln, b,c: Blätter

Tab.19: Substratspezifität solubilisierter und unlöslicher Phosphatase aus Plasmalemma von Blättern und Wurzeln von *P.coronopus*

Substrat	Phosphatase (I der Kontrolle mit ATP)			
	Blatt		Wurzel	
	KBr/TRITON	OG/DOC	unlös.	OG/DOC
ATP	100	100	100	100
ATP/ VO_4^{3-}	60	38	82	34
ADP	215	37	219	23
AMP	4	1	2	0
GTP	90	51	69	14
CTP	118	51	117	20
UTP	85	39	73	18
ITP	90	25	95	12
PP _i	10	17	11	6
PNPP	13	3	66	0

Abkürzungen: KBr/TRITON: KBr/TRITON-lösliche Fraktion; OG/DOC: Octylglucosid/Deoxycholat-lösliche Fraktion; unlös.: Lyso-phosphatidylcholin-unlöslicher Rückstand; VO_4^{3-} : 50 μM Na_2VO_4 in Ansatz

Während die KBr/TRITON-lösliche und die unlösliche Fraktion beide keine Spezifität für ATP aufweisen und durch Vanadat nur wenig gehemmt werden (Tab.19), lassen sich die beiden Aktivitäten doch deutlich anhand der völlig unterschiedlichen pH-Profile trennen. Die erste lösliche Fraktion zeigt eine pH-Abhängigkeit ähnlich der nativen ATPase, aber auch der löslichen Phosphatase. Die in

den Membranen verbleibende unlösliche Aktivität wies dagegen im untersuchten Bereich kein Optimum auf. In Kombination mit der Substratspezifität ist zu folgern, daß durch die KBr-Behandlung der größte Teil der unspezifischen Phosphatase von den Membranen gelöst worden war. Die mit Octylglucosid/DOC lösliche, wesentlich spezifischere und Vanadat-sensitive Aktivität zeigt dasselbe pH-Optimum wie die native ATPase und auch keine Verbesserung der Substratspezifität gegenüber dem membrangebundenen Enzym. Die Nebenaktivität liegt bei den Blättern mit ca. 50 % für andere Trinukleotide im Gegenteil noch höher. Die elektrophoretische Analyse (Abb.36) zeigt eine Vielzahl von Polypeptiden in dieser Fraktion aus Wurzeln, während die Blatt-Präparationen drei Hauptbanden bei 105, 55 und 28 kD enthalten.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß durch die KBr/TRITON-Behandlung der Membranen aus den Blättern die unspezifische Phosphatase weitgehend entfernt werden konnte. Die ATPase selber ist sowohl aus Wurzel- als auch aus Blattplasmalemma durch Octylglucosid/DOC vollständig extrahierbar, weist aber keine höhere Spezifität als in nativen Membranen aus Wurzeln auf. Ob die Phosphatase-Aktivität mit anderen Substraten als ATP eine Eigenschaft der ATPase selber ist, oder durch Kontamination mit einer Phosphatase-Aktivität bedingt ist, die zwar Nukleotide, nicht aber PNPP als Substrat annimmt, ließ sich nicht klären.

6.2. ATPase aus *P. major*

Bei den Versuchen am Glykophyten *P. major* zeigte sich, daß im letzten Solubilisierungsschritt mit Lysophosphatidylcholin eine ATPase-Aktivität eluiert werden konnte, die im Falle der ssp. *major* das bekannte, scharfe pH-Profil mit einem pH-Optimum bei 6.1 zeigte (Abb.37).

Bei der ssp. *pleiosperma*, in der das Enzym ein etwas breiteres Optimum aufwies, wurden weitere Parameter untersucht. So konnte eine Substratspezifität festgestellt werden (Tab.20), die sich wenig von der an nativen Membranen gemessenen unterschied.

Wenn auch die unspezifische Aktivität mit PNPP durch die schrittweise Solubilisierung vollständig eliminiert werden konnte, so

erreichte das Enzym mit anderen Trinukleotiden immerhin Aktivitäten bis zu 35 % der Kontrolle.

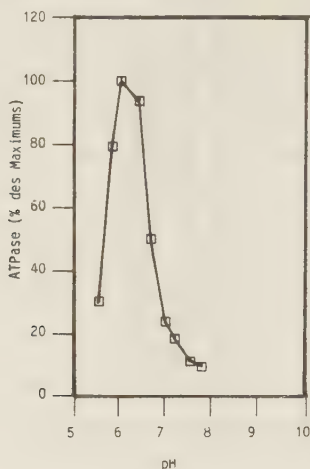


Abb. 37: pH-Abhängigkeit der Lysophosphatidylcholin-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. major* ssp. *major* Wurzeln

Tab. 20: Substratspezifität der Lysophosphatidylcholin-löslichen Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P. major* ssp. *pleiosperma*

Substrat	Aktivität (% der Kontrolle mit ATP)
ATP	100
ADP	25
AMP	2
GTP	35
CTP	21
UTP	21
ITP	24
PP _i	3
PNPP	0

Die Analyse der Enzymkinetik (Abb. 38) ergab erwartungsgemäß eine Sättigungskinetik nach Michaelis-Menten mit einer K_m von 0.20 mM $MgATP^{2-}$. Dieser Wert liegt etwas tiefer als der an nativem Enzym aus ssp. *major* gemessene.

Die elektrophoretische Untersuchung (Abb. 39) der aktiven Fraktion zeigte eine breite Bande bei ca. 90 kD sowie die bereits aus *P. coronopus* bekannten Peptide mit ca. 105, 55 und 28 kD (s. Pfeile).

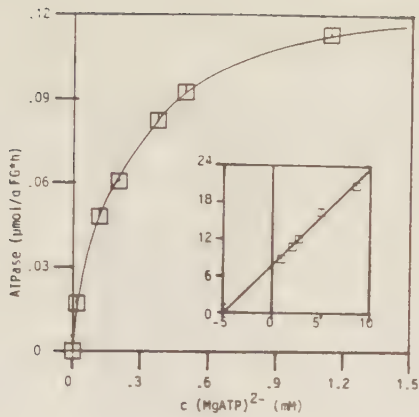


Abb.38: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. major* ssp. *pleiosperma* Wurzeln. Kleine Abb.: Lineweaver-Burk-Plot.

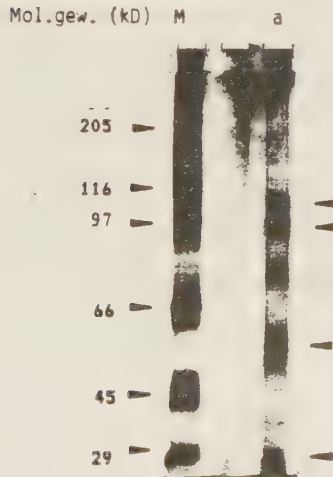


Abb.39: SDS-PAGE a: LP-löslichen Proteine aus Plasmalemma von *P. major* ssp. *pleiosperma* Wurzeln, M: Markerproteine

6.3. ATPase aus *P. lanceolata*, *P. maritima* und *P. crassifolia*

Die drei Arten *P. lanceolata*, *P. maritima* und *P. crassifolia* zeigten sehr ähnliches Verhalten in den Lösungs- und biochemischen Eigenschaften der Plasmalemma-ATPase und werden deshalb gemeinsam

behandelt.

Am Beispiel von *P.maritima* sei in Abb.40 und 41 und Tab.21 gezeigt, wie sich Phosphatasen durch KBr/TRITON, Octylglucosid/DOC und Lysophosphatidylcholin extrahieren lassen.

Abb.40 zeigt die normierten pH-Profile der ATPase-Aktivität in den drei gelösten Fraktionen. Die ersten beiden Fraktionen (KBr/TRITON und Octylglucosid/DOC) zeigen breitere Optima als die mit Lysophosphatidylcholin lösliche. Die Substratspezifität ist in der dritten Fraktion ebenfalls weitaus höher (Tab.21). Im Gegensatz zu den ersten beiden Lösungen tritt hier keine Nebenaktivität mit anderen Nukleotiden oder PNPP mehr auf, es konnte eine absolut spezifische ATPase-Aktivität extrahiert werden. Die Proteinmuster dieser drei Fraktionen (Abb.41) sind sich sehr ähnlich. Im Molekulargewichtsbereich um 100 kD fällt in der KBr/TRITON-löslichen Fraktion eine Bande bei ca. 105 kD auf. Diese ist in der nächsten, Octylglucosid/DOC-löslichen Fraktion sehr viel schwächer ausgeprägt. Dafür tritt jetzt eine Bande bei ca. 90 kD mehr in Erscheinung, die schließlich in der Lysophosphatidylcholin-Fraktion den gesamten Bereich überdeckt. Auch hier ist jedoch die 105 kD-Bande noch sichtbar. Auffällige Banden, die in den ersten beiden Fraktionen auftreten, in der dritten aber nicht mehr vorhanden sind und deshalb mit der unspezifischen Nebenaktivität korrelieren, konnten nicht beobachtet werden.

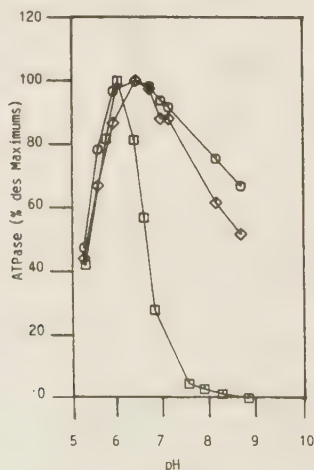


Abb.40: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in der (◇) KBr/TRITON-, (○) Octylglucosid/DOC- und (□) LP-löslichen Fraktion aus *Plasmodium* von *P.maritima* Wurzeln.

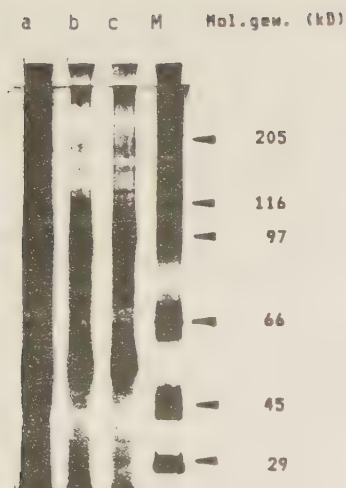


Abb. 41: SDS-PAGE der löslichen Fraktionen aus Plasmalemma von *P. maritima*-Wurzeln. a: LP-löslich, b: Octylglucosid/DOC-löslich, c: KBr/TRITON-löslich, M: Markerproteine.

Tab. 21: Substratspezifität von solubilisierter Phosphatase aus Plasmalemma von *P. maritima*-Wurzeln

Substrat	relative Phosphatase-Aktivität (% der Aktivität mit ATP)		
	KBr/TRITON	OG/DOC	LP
ATP	100	100	100
ADP	28	34	12
AMP	0	0	0
GTP	46	59	-
CTP	26	30	0
UTP	32	40	0
ITP	40	47	0
PP _i	5	6	0
PNPP	9	6	0

Abkürzungen: KBr/TRITON: KBr/TRITON-lösliche

Fraktion; OG/DOC: Octylglucosid/DOC-lösl. Fr.,

LP: Lysophosphatidylcholin-lösl. Fr.

6.3.1. pH-Optima der mit Lysophosphatidylcholin löslichen ATPase

An *P. maritima* wurde gezeigt, daß zwar durch die KBr/TRITON und

Octylglucosid/DOC-Behandlung ein gewisser Teil der ATPase aus den Membranen extrahiert wurde und somit nicht mehr für die Analyse zur Verfügung stand. Das Hauptziel dieser schrittweisen Solubilisierung, nämlich die Entfernung unspezifischer Phosphatase-Aktivität und die Darstellung einer hochspezifischen ATPase wurde aber mit dieser Methode erreicht. *P.lanceolata* und *P.crassifolia* verhielten sich ähnlich, so daß diese drei Arten im Folgenden gemeinsam behandelt werden. Dabei wurden salzbehandelte Pflanzen der halophytischen Arten in die Analysen einbezogen.

Die pH-Abhängigkeit der ATPase-Reaktion ist in Abb.42 und 43 gezeigt.

In allen untersuchten Präparationen konnten sehr scharfe pH-Optima bei pH 6.2 ermittelt werden. Weder zwischen den Arten, noch zwischen salzbehandelten und Kontrollpflanzen fanden sich Unterschiede. Lediglich die ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten *P.maritima* wies ein etwas breiteres Optimum auf als die übrigen drei aus dieser Art untersuchten Präparationen. Insgesamt konnten die an nativem Plasmalemma gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Stabilität des pH-Optimums auch unter salinen Kulturbedingungen an den solubilisierten ATPasen bestätigt werden.

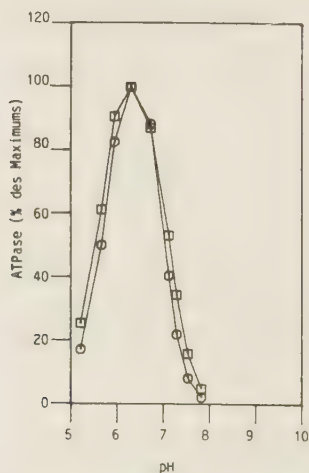


Abb.42: pH-Abhängigkeit der LP-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P.crassifolia*-Blättern. (□): Kontrolle, (○): salzbehandelte Pflanzen.

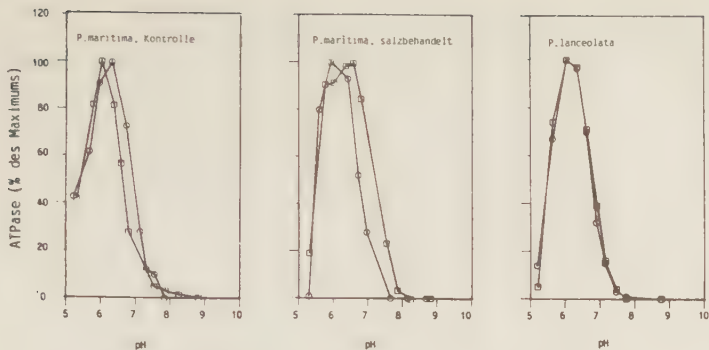


Abb.43: pH-Abhängigkeit der LP-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. maritima* und *P. lanceolata*. (○): Blätter, (□): Wurzeln. *P. maritima*, Kontrolle; *P. maritima*, Salzbehandelt; *P. lanceolata*.

6.3.2. Substratspezifität

Die Tabellen 22 und 23 geben die Substratspezifität der solubilisierten ATPase aus allen drei Arten wieder.

Tab.22: Substratspezifität der Lysophosphatidylcholin-löslichen Plasmalemma-ATPase aus *P. lanceolata* und *P. maritima*.

Substrat	Aktivität (% der Kontrolle mit ATP)					
	<i>P. lanceolata</i>		<i>P. maritima</i>			
	M	B	KW	SW	KB	SW
ATP	100	100	100	100	100	100
ADP	0	9	12	11	13	12
AMP	0	9	0	1	6	0
GTP	5	2	-	0	8	3
CTP	0	4	0	0	18	5
UTP	0	3	0	0	14	5
ITP	8	0	0	0	9	5
PP _i	0	1	0	0	9	0
PNPP	0	3	0	1	10	1

Abb.: B: Blatt, M: Wurzel, K: Kontrolle, S: Salzbehandelt

Tab.23: Substratspezifität der aus Plasmalemma von *P.crassifolia*-Blättern solubilisierten Phosphatase-Aktivitäten

Substrat	Aktivität (% der Kontrolle mit ATP)			
	Kontrollpflanzen		salzbeh. Pflanzen	
	KBr/TRITON	OG/DOC	LP	LP
ATP	100	100	100	100
ADP	121	37	7	3
AMP	23	4	0	0
GTP	51	27	1	0
CTP	51	37	7	3
UTP	46	32	3	0
ITP	52	31	3	0
PP _i	26	10	1	0
PNPP	33	17	0	0

Abkürzungen: KBr/TRITON: KBr/TRITON-lösl.Fraktion;
OG/DOC: Octylglucosid-Deoxycholat-lösliche Fraktion;
LP: Lysophosphatidylcholin-lösl. Fraktion

Bei *P.crassifolia* sind auch die Substratspezifitäten der in den ersten beiden Solubilisierungsschritten gelösten Phosphatase aufgeführt. Durch die KBr/TRITON-Behandlung wird auch in dieser Art unspezifische Phosphatase, die eine hohe Affinität für ADP zeigt, bereits im ersten Lösungsschritt zum größten Teil entfernt. Für die mit Lysophosphatidylcholin gelöste ATPase konnte in allen Fällen eine absolute Spezifität für ATP nachgewiesen werden. Lediglich die Präparation aus Wurzeln salzbehandelter *P.maritima* zeigte noch 10 % Basisaktivität mit PNPP. Diese geringere Spezifität korreliert mit dem breiteren pH-Optimum (s.o.).

6.3.3. Reaktion der solubilisierten ATPase auf Hemmstoffe

An den nativen Plasmalemma-ATPasen aus *P.lanceolata* und *P.maritima* wurde gezeigt, daß dieses Enzym spezifisch durch Vanadat und DCCD gehemmt wird. Auf andere Phosphatase-Inhibitoren reagierte das Enzym nicht mit Hemmung (Kap. 4.2.2.3., 5.1.1. und 5.2.2.). Dieses Verhalten konnte an solubilisiertem Enzym bestätigt werden (Tab.24).

In allen Fällen wirkten von den untersuchten Hemmstoffen nur Vanadat, Fluorid und DCCD deutlich hemmend, wobei das Ausmaß dieses Effektes von der Inhibitorkonzentration abhängig war. Gewisse Unterschiede zwischen den Arten im Grad der Hemmung

beruhen vermutlich auf schwankenden Lysophosphatidylcholin-Gehalten in den Testansätzen, da die Präparationen je nach Aktivität zum Teil unterschiedlich verdünnt wurden.

Tab.24: Einfluß von Phosphataseinhibitoren auf Lysophosphatidylcholin-lösliche Plasmalemma-ATPase aus *P.lanceolata*, *P.maritima* und *P.crassifolia*

Inhibitor	Aktivität (% der Kontrolle)				
	<i>P.lanceolata</i>	<i>P.maritima</i>		<i>P.crassifolia</i>	
	B	KW	KB	SB	KB
ohne	100	100	100	100	100
KNO ₃	83	96	106	96	97
Na ₂ VO ₄	65	55	0*	7*	5
Na ₂ MoO ₄	92	89	90	84*	88
NaN ₃	100	85	113	112	103
DCCD	36	37	20	17	18
Oligomycin	112	88	109	94	101
Quabain	-	-	-	-	106
KF	16	0	-	-	3

Konzentrationen der Inhibitoren: KNO₃ und KF: 45 mM; Na₂VO₄, Na₂MoO₄ und DCCD: 100 µM; NaN₃: 1 mM; Oligomycin: 10 µg/ml; Quabain: 10 µM; Ausnahmen: a: 1 mM, b: 500 µM. - : nicht bestimmt.
B: Blatt, W: Wurzel, K: Kontrolle, S: salzbehandelt

6.3.4. Kinetische Analysen der solubilisierten ATPase

Die kinetischen Untersuchungen hatten für die native Plasmalemma-ATPase K_m -Werte von 0.31 bis 0.45 mM MgATP²⁻ bei fünf der untersuchten Arten ergeben (Kap. 5.1.6.). Die Resultate der kinetischen Analysen an den solubilisierten Proteinen aus *P.crassifolia*, *P.maritima* und *P.lanceolata* sind in den Abb.44-46 dargestellt.

In allen Fällen wurden Sättigungskinetiken beobachtet und die Maximalaktivitäten liegen mit Ausnahme der Präparation aus den Wurzeln salzbehandelter *P.maritima* alle bei etwa 0.10 - 0.15 µmol/g FG * h. Die Michaelis-Konstanten sind in Tab.25 zusammengefaßt.

Tab.25: Michaelis-Konstanten der solubilisierten Plasmalemma-ATPase aus *P.lanceolata*, *P.maritima* und *P.crassifolia*

	<i>P.lanceolata</i>	<i>P.maritima</i>				<i>P.crassifolia</i>	
	B	KW	KB	SW	SB	KB	SB
K_m (mM)	0.17	0.14	0.18	0.31	0.20	0.31	0.26

Abkürzungen s.Tab.24.

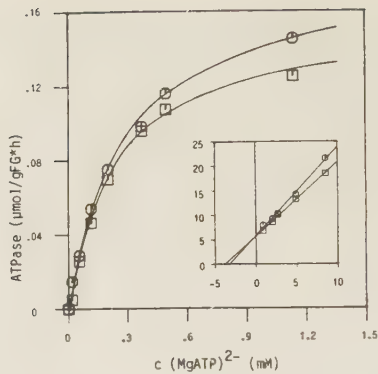


Abb. 44: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen Plasmalemma-ATPase aus Blättern von *P. crassifolia*. (○): Kontrolle, (□): salzbehandelte Pflanzen. Kleine Abb.: Lineweaver-Burk-Plot.

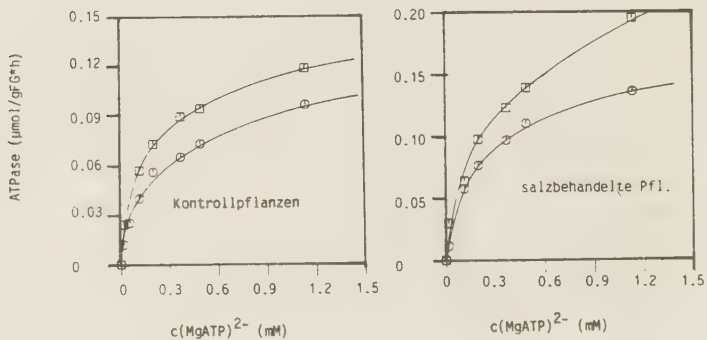


Abb. 45: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen Plasmalemma-ATPase aus (○) Blättern und (□) Wurzeln von *P. maritima*.

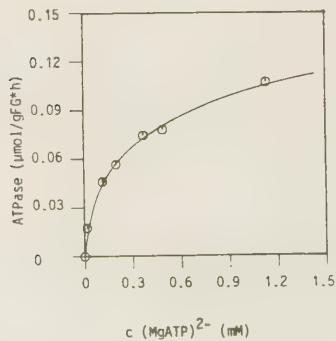


Abb. 46: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen Plasmalemma-ATPase aus Blättern von *P. lanceolata*.

Die für *P.lanceolata* und *P.maritima* ermittelten Werte liegen etwas niedriger als im nativen Enzym (s.Tab.15, Kap.5.1.6.). Die solubilisierete ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten *P.maritima* fällt aus dieser Tendenz heraus und weist einen etwas höheren Wert als im nativen Zustand auf. In *P.crassifolia* liegen die K_m -Werte nahe bei dem Wert, der an nativem Plasmalemma aus Wurzeln ermittelt wurde. Da in *P.maritima* die Veränderung der K_m -Werte in den Wurzeln durch die Salzbehandlung in den nativen Membranen genau in die umgekehrte Richtung geht wie im solubilisierten Enzym, handelt es sich hierbei nicht um einen durch die Behandlung der Pflanzen induzierten Effekt.

6.3.5. Elektrophoretische Untersuchungen

An *P.crassifolia*-Blättern ist in Abb.47 gezeigt, wie sich die Proteinmuster der unterschiedlich löslichen Fraktionen unterscheiden.



Abb.47: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Proteine aus Blatt-Plasmalemma von *P.crassifolia*. a: KBr/TRITON-löslich, b: Octylglucosid/DOC-löslich, c: LP-unlöslich, d-f: LP-löslich: d,e: Kontrolle, f: salzbehandelte Pflanzen.

Während durch KBr/TRITON eine Vielzahl von locker assoziierten Proteinen von den Membranen entfernt wird, zeichnet sich die

Octylglucosid/DOC-lösliche Fraktion durch fünf Hauptbanden bei ca. 135, 105, 79, 61 und 28 kD aus. Hiervon finden sich in dem in Lysophosphatidylcholin unlöslichen Rest vorwiegend die beiden Banden bei 61 und 28 kD wieder. Diese Proteine sind zum Teil durch das Phospholipid extrahierbar. In der phospholipidlöslichen Fraktion, die hochspezifische ATPase-Aktivität zeigte, ist auch ein hoher Anteil eines 105 kD-Polypeptids zu finden. Dieses Protein tritt in zwei verschiedenen Aufschlüssen aus Kontrollpflanzen und in dem Aufschluß aus salzbehandelten Pflanzen etwa gleich intensiv. Ein Hinweis auf die Ausbildung zusätzlicher Proteine in der lysophosphatidylcholinlöslichen Fraktion unter Salzbehandlung konnte nicht gefunden werden.

Sehr ähnliche Polypeptidmuster wurden in den Präparationen aus *P.lanceolata*- und *P.maritima*-Blättern erhalten (Abb.48).



Abb.48: SDS-PAGE der LP-löslichen Proteine aus Plasmalemma von *P.maritima* und *P.lanceolata*: a - c: *P.maritima*-Wurzeln; a und b: Kontrollpflanzen, c: salzbehandelte Pflanzen, d: *P.lanceolata*, Blätter, e und f: *P.maritima*, Blätter; e: Kontrollpflanzen, f: salzbehandelte Pflanzen.

P.lanceolata zeigt im Bereich um 100 kD lediglich die von *P. crassifolia* bekannte 105 kD-Bande, während *P.maritima* zusätzlich

eine deutlich hiervon getrennte breite Bande bei 90 kD aufweist. Diese 90 kD-Bande überdeckt in den Wurzelpräparationen den gesamten Bereich, doch hatte eine genaue Analyse einer entsprechenden Probe in dem Gel der Abb. 42 gezeigt, daß sich hierunter ebenfalls eine 105 kD-Bande verbirgt. Die in den Präparationen aus *P. crassifolia* starke Bande bei 79 kD fällt in diesen beiden Arten nicht ins Gewicht.

6.4. Diskussion

In diesem Kapitel wurde gezeigt, daß Plasmalemma-ATPase aus fünf untersuchten *Plantago*-Arten durch Verwendung von Detergenzien und Phospholipiden in aktiver Form solubilisiert werden kann. Dabei unterscheiden sich die Arten hinsichtlich der Löslichkeit der ATPase und der Substratspezifität der erhaltenen Präparationen.

In *P. coronopus* wurde bereits die gesamte ATPase-Aktivität durch die Behandlung mit Octylglucosid und DOC solubilisiert. Die dabei erhaltene Präparation zeigte das gleiche breite pH-Optimum wie das native Enzym, lieferte aber keine Phosphatase-Aktivität mit PNPP. Durch die Vorbehandlung mit hoher Salzkonzentration und TRITON war es also gelungen, die unspezifische Phosphatase-Aktivität mit PNPP vollständig von den Membranen abzuwaschen. Dennoch zeigte die solubilisierete ATPase auch Aktivität mit anderen Nukleotiden in ähnlichem Ausmaß wie im nativen Zustand. Das Löslichkeitsverhalten der ATPase aus dieser Art ähnelt demjenigen von *Beta vulgaris* (O'Neill und Spanswick 1984a). Auch in dieser Art läßt sich das Enzym durch Octylglucosid und DOC vollständig aus dem Plasmalemma extrahieren, ist aber erheblich spezifischer für ATP als in *P. coronopus*.

Die Plasmalemma-ATPase aus *P. major* ließ sich im Unterschied zu *P. coronopus* nicht vollständig mit Octylglucosid und DOC extrahieren. Vielmehr gelang es in dieser Art wie in *Lycopersicon esculentum*, das Enzym mit Lysophosphatidylcholin in Lösung zu bringen, nachdem die Phospholipide durch DOC aus der Membran extrahiert worden waren (Anthon und Spanswick 1986). Die biochemischen Eigenschaften der ATPase gleichen mit einem engen pH-Optimum bei der ssp. *major* und maximal 34 % Phosphatase-Aktivität mit anderen Nukleotiden bei der ssp. *pieiosperma* denjenigen des

nativen Enzyms. Auch in dieser Unterart konnte die Aktivität mit PNPP vollständig eliminiert werden. Die Spezifität entsprach damit genau den Werten, die Staal et al. (1987) für das native Enzym aus Wurzeln derselben Unterart fanden.

Im Unterschied zu den beiden bisher behandelten Arten gelang es in *P. crassifolia*, *P. maritima* und *P. lanceolata* mit Lysophosphatidylcholin eine ATPase-Aktivität zu solubilisieren, die enge pH-Optima und absolute Spezifität für ATP zeigte. Lediglich die Präparation aus Wurzeln salzbehandelter *P. maritima* zeigte etwa 10 % Aktivität mit PNPP. Wenn man diese 10 % von allen anderen Werten abzieht, erhält man etwa die gleichen Werte wie bei den Kontrollpflanzen. Es liegt daher nahe, diese Nebenaktivität einer Kontamination zuzuschreiben. Als Hinweis auf die Ausbildung einer ATPase mit anderen biochemischen Eigenschaften ist dieses Ergebnis nicht anzusehen. Diese Interpretation wird durch das etwas breitere pH-Optimum im Vergleich zu den übrigen Präparationen gestützt.

Ein Literaturvergleich zeigt, daß eine gleich hohe Spezifität in *Avena sativa* (Vara und Serrano 1982 und Sommarin et al. 1985), *Cucumis sativus* (Memon et al. 1987), *Neurospora crassa* (Böwman et al. 1981) und *Raphanus sativus* (Cocucci und Marre 1984) gefunden wurde. Spezifität in der Qualität, wie sie bei *P. coronopus* und *P. major* ssp. *pleiosperma* beobachtet wurde, fand sich in *Dactylis glomerata* (Yoshida et al. 1983) und *Triticum aestivum* (Sommarin et al. 1985). Bei dieser Zusammenstellung wurden Berichte von ATPase-Präparationen, die noch PNPPase-Aktivität aufwiesen, nicht berücksichtigt. Auffällig ist, daß in allen vier Fällen, in denen niedrigere Spezifität auftrat (*P. coronopus* und *P. major* ssp. *pleiosperma*, *T. aestivum* und *D. glomerata*), die erhaltenen pH-Optima breiter waren als in den hoch spezifischen Präparationen. Der Grund hierfür kann entweder in einer Kontamination durch eine unspezifische Phosphatase oder in einer geringfügigen Modifikation des Enzyms liegen. Für die Erniedrigung der Bindungsspezifität würde der Austausch einer einzigen Aminosäure ausreichen. Bei den im Verhältnis zu ATP niedrigeren zellulären Konzentrationen an anderen Trinukleotiden hätte ein derartiger Austausch keine signifikanten physiologischen Folgen für die Zellfunktionen.

Hinweise darauf, daß die niedrigere Spezifität aber wahrscheinli-

cher auf einer Kontamination beruht, ergeben sich aus einem Vergleich der solubilisierten Enzyme aus *P.coronopus*, *crassifolia* und *maritima*. Obwohl die native ATPase aus *P.crassifolia* und *P.coronopus* relativ breite pH-Optima zeigt und dies auch in der mit Octylglucosid und DCC solubilisierten ATPase aus *P.coronopus* bestätigt wurde, entspricht die mit Lysophosphatidylcholin solubilisierete ATPase aus *P.crassifolia* in allen biochemischen Eigenschaften dem Enzym aus *P.lanceolata* und *P.maritima*. Die Beobachtung, daß die Octylglucosid/DCC-lösliche Fraktion aus *P.maritima*-Wurzeln ein relativ breites pH-Optimum und eine ähnliche Substratspezifität wie in *P.coronopus* zeigt, weist darauf hin, daß das solubilisierete wie das native Enzym aus letzterer Art unspezifische Phosphatase enthält. Danach würde das in der Breite des pH-Optimums von allen anderen untersuchten *Plantago*-Arten abweichende Verhalten der Plasmalemma-ATPase aus *P.coronopus* nicht auf unterschiedlichen Eigenschaften des Enzyms selbst beruhen. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, daß eine höhere Kontamination mit unspezifischer Phosphatase als in den anderen Arten zur Verbreiterung des pH-Optimums im nativen wie im solubilisierten Zustand führt. Das im Verhältnis zu den übrigen Arten andere Löslichkeitsverhalten der ATPase beruht vermutlich auf einer anderen Lipidzusammensetzung der Membranen (Erdei et al. 1980).

Ein Vergleich der Affinitäten der solubilisierten Enzyme für andere Nukleotide als ATP zeigt, daß in allen Fällen außer bei *P.major* ssp. *pleiosperma* mit dem Substrat CTP die höchste Nebenaktivität gefunden wurde. Dieses Ergebnis an sehr sauberen Enzympräparationen kann in Kombination mit der meist völlig fehlenden Reaktivität mit UTP als Hinweis dafür angesehen werden, daß die Nukleotidbindungsstelle des Enzyms eher die Aminogruppe für die Bindung nutzt als die Heterocyclenringe selber. Eine Carboxyfunktion in α -Stellung zum Hetero-Stickstoffatom des Ringes scheint die Bindung des Substrats an das Enzym zu verhindern.

Ein auffälliges Ergebnis der biochemischen Analysen der solubilisierten ATPasen war die Beobachtung, daß bei *P.major*, *P.maritima* und *P.lanceolata* eine gewisse Tendenz zu erniedrigten K_m -Werten im Vergleich zu nativen Enzymen auftrat. So liegen von sechs untersuchten Präparationen die K_m -Werte in fünf Fällen niedriger als in vergleichbaren nativen Enzymen. Eine Adaptation an saline Wachstumsbedingungen konnte auch in den kinetischen Daten nicht

beobachtet werden. Dies wird insbesondere dadurch deutlich, daß bei den Wurzeln von *P.maritima* das native Enzym unter salinen Anzuchtbedingungen eine niedrigere, das solubilisierete Enzym aber eine höhere K_m als in den Kontrollpflanzen zeigte. Offenbar hat die Reinheit der Präparation einen wichtigen Einfluß auf die Genauigkeit dieses Zahlenwertes. Dies ergibt sich im Falle der solubilisierten ATPase aus salzbehandelten *P.maritima* aus der Korrelation der Abweichung von den übrigen Präparationen in den drei Parametern Breite des pH-Optimums, Substratspezifität und K_m -Wert. Die in den anderen Präparationen aus *P.maritima*, *major* und *P.lanceolata* zu verzeichnende Tendenz zu niedrigeren K_m -Werten im Verhältnis zum nativen Enzym kann verschiedene Ursachen haben. Einmal liegt unter den Meßbedingungen in ca. 0.025 % Lysophosphatidylcholin eine andere physikalische und biochemische Umgebung vor als in der nativen Membran. Dies kann zu leichten Strukturveränderungen des Proteins führen. Weiterhin können andere Membranproteine in der nativen Membran über Protein/Protein-Wechselwirkungen einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms haben. Auch die in Kap. 5.1.7. schon angesprochene Problematik der Berechnung des K_m -Wertes aufgrund von kalkulierten $MgATP^{2-}$ -Konzentrationen ist in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß sich die K_m -Werte in *P.maritima* und *P.lanceolata* durch die Solubilisierung tendenziell etwas nach unten verschieben, aber in derselben Größenordnung bleiben wie in den nativen Enzymen. Signifikante Unterschiede zwischen salzbehandelten und Kontrollpflanzen von *P.maritima* und *P.crassifolia* konnten weder in den kinetischen, noch in anderen biochemischen Eigenschaften gefunden werden. Die Ergebnisse an nativen Membranen wurden somit durch die Solubilisierungsexperimente bestätigt.

Nach Sze (1984,1985) und Serrano (1984a) weist die Plasmalemma-ATPase aus den bisher untersuchten Kulturpflanzen ein Molekulargewicht von 90 - 105 kD auf. Während in Präparationen aus *P.crassifolia*, *P.coronopus*, *P.lanceolata* und Blättern von *P.maritima* eine deutliche Bande bei 105 kD festgestellt wurde, überdeckte in Präparationen aus *P.major* und aus Wurzeln von *P.maritima* eine breite Bande bei 90 kD diesen Bereich. Allerdings tritt die 105 kD-Bande aus den Blättern von *P.maritima* auch in einigen Präparationen aus den Wurzeln dieser Art auf. Es ist daher sehr wahr-

scheinlich, daß es sich bei dem 105 kD-Protein in allen Arten um die ATPase handelt.

Ob die in *P.maritima* und *P.major* auftretende breite 90 kD-Bande ein oder mehrere Polypeptide repräsentiert, kann aus den Gelen nicht erkannt werden. Mit den zur Verfügung stehenden Methoden läßt sich zur Zeit auch nicht entscheiden, ob es sich bei dieser Bande um ein anderes Protein als die ATPase oder um ein Abbauprodukt des 105 kD-Protein handelt.

Hinsichtlich der möglichen Kontamination der Präparation aus Wurzeln salzbehandelter *P.maritima* mit unspezifischer Phosphatase liefert die elektrophoretische Analyse keine zusätzlichen Anhaltspunkte. Gleiches gilt für die solubilisierete ATPase aus *P.major* und *P.coronopus*, da in allen Fällen keine zusätzlichen Banden im Gel auftraten, die nicht auch in den hochspezifischen Präparationen aus *P.crassifolia* oder *P.lanceolata* vorhanden sind. Entweder beruht die Nebenaktivität also auf einem Protein mit einem niedrigen Molekulargewicht (unter 25 kD), oder sie ist nur in so niedrigen Spuren vorhanden, daß sie im Gel nicht zu erkennen ist. Die Möglichkeit, daß eine unspezifische Hydrolase kleiner als 25 kD ist, erscheint durchaus wahrscheinlich, da an ein solches Enzym keine hohen Anforderungen hinsichtlich großer funktioneller Gruppen für Erkennungsprozesse gestellt werden müssen. So weist beispielsweise die Pankreas-RNase, die immerhin spezifisch für RNA ist, nur 124 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 12.6 kD auf (Karlson 1977 und Lehninger 1979).

Zusammenfassend läßt sich für alle gelelektrophoretischen Analysen folgendes festhalten:

In allen analysierten, enzymatisch aktiven und hoch spezifischen lysophosphatidylcholinlöslichen ATPase-Präparationen aus Blättern von *Plantago*-Arten sind Polypeptide mit Molekulargewichte um 105, 55 und 29 kD enthalten. In Wurzel-Präparationen aus *P.maritima* und *P.major* tritt eine zusätzliche, breite Bande bei 90 kD auf. Zwischen salzbehandelten und Kontrollpflanzen konnten weder in Blättern, noch in Wurzeln Unterschiede festgestellt werden. Aus einem Vergleich mit den in der Literatur publizierten Daten wird geschlossen, daß es sich bei dem 105 kD-Protein um die Plasmalemma-ATPase handelt. Im Falle der *P.maritima*-Wurzeln ist es wahrscheinlich, daß ein unter der breiten 90 kD-Bande schlecht

erkennbares 105 kD-Protein die ATPase darstellt. Möglicherweise handelt es sich bei dem 90 kD-Peptid um ein anderes Protein oder ein Abbauprodukt des 105 kD-Peptids.

Anhand der elektrophoretischen Eigenschaften konnten die durch biochemische Analysen an nativen und solubilisierten ATPase-Präparationen gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden, daß die Plasmalemma-ATPase innerhalb des Genus *Plantago* konservativ ist und auch durch saline Kulturbedingungen keine Ausbildung eines zusätzlichen Enzyms induziert wird.

7. Zur Rolle der Plasmalemma-ATPase in der Kontrolle der NaCl-Aufnahme in halophytischen *Plantago*-Arten

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse haben gezeigt, daß sich in der Gattung *Plantago* Plasmalemma-ATPasen aus Wurzeln in salztoleranten Vertretern weder in biochemischen noch in elektro-phoretischen Eigenschaften signifikant von den Enzymen aus salz-sensitiven Arten unterscheiden. Auch unter salinen Wachstumsbe-dingungen verändern sich die Eigenschaften des Enzyms nicht, obwohl diese Arten unter den geänderten Kulturbedingungen ein deutlich anderes Aufnahmeverhalten für Wasser und Ionen zeigen. Diese Ergebnisse stehen im deutlichen Widerspruch zu den von Comerford et al. (1985) und Braun et al. (1986) publizierten Daten, wonach saline Kulturbedingungen die biochemischen Eigen-schaften der Plasmalemma-ATPase von *Atriplex nummularia* bzw. *Debaryomyces hansenii* drastisch ändern. Auch die von Vakhmistrov et al. (1982) berichteten Eigenschaften der Plasmalemma-ATPase von *Halococcus strobilaceus*, die an die tierische Na/K-ATPase erinnern, konnten in den untersuchten halophilen Vertretern der Gattung *Plantago* nicht bestätigt werden. Diese Gegensätze beruhen meiner Ansicht nach nicht auf artspezifischen Unterschieden in den biochemischen Eigenschaften der Plasmalemma-ATPase, sondern scheinen ihre Ursache eher in den verschiedenen methodischen Ansätzen zur Isolation von Plasmalemma zu haben.

Comerford und Mitarbeiter isolierten ihre an Plasmalemma angerei-cherten Membranfraktionen aus exponentiell wachsenden Hefezellen, indem sie ein 20000 - 100000 g Pellet von "crude microsomes" durch ein Saccharosekissen der Dichte 1.17 g/cm^3 zentrifugier-ten. Eine Analyse dieser Membranfraktion auf kontaminierende Bestandteile erfolgte nicht. Da Mitochondrienmembranen eine Dich-te von über 1.17 g/cm^3 in Saccharose aufweisen (Mandala et al. 1982), und die mitochondriale F_0-F_1 -ATPase ein pH-Optimum von 8.0 zeigt (Wang und Sze 1986), erscheint es wahrscheinlich, daß die Präparation aus salzbehandelten Hefen mitochondriale Membranen enthielt. Es ist durchaus möglich, daß die Behandlung der Hefen mit 1.5 M NaCl zu einem völlig anderen Verhalten der osmotisch adaptierten Organellen während des unveränderten Aufschlusses führt und die Zusammensetzung der "crude microsomes" daher anders ist als unter den Kontrollbedingungen. Mit der gewählten Trennme-thode können dann Plasmalemma und mitochondriale Membranen nicht

mehr voneinander getrennt werden. Die Vermutung, daß es sich bei den aus salzbehandelten Zellen isolierten Membranen nicht um sauberes Plasmalemma handelt, wird durch die fehlende Substratspezifität an beiden Maxima gestützt. Ob sich die Plasmalemma-ATPase dieser Art unter salinen Kulturbedingungen tatsächlich in ihren biochemischen Eigenschaften ändert, kann meines Erachtens nur geklärt werden, wenn die Reinheit der isolierten Membranen bewiesen ist.

Bei der Publikation von Braun et al. (1986) fällt zunächst auf, daß sich die Charakterisierung der aus einem diskontinuierlichen Dichtegradienten isolierten Membranen auf die Messung der Oligomycin-Sensitivität des ATP-abhängigen elektrischen Gradienten und auf die elektronenmikroskopische Analyse der Membranen aus Kontrollpflanzen beschränkt. Oligomycin hatte auf die Aktivität keinen Einfluß, woraus die Autoren zu Recht auf die Abwesenheit von mitochondrialer Kontamination schließen. Die für Plasmalemma spezifische Färbung nach Roland (1972) mit Phosphorwolframsäure führte im elektronenmikroskopischen Bild zu einer Anfärbung bei etwa 30 % der erhaltenen Vesikel. Vergleichbare Literaturdaten liegen von Uemura und Yoshida (1983) vor. Diese Autoren isolierten Plasmalemmavesikel aus *Secale cereale* mit dem Zweiphasensystem. Die erhaltenen Membranen wurden mit Phosphorwolframsäure zu über 90 % angefärbt. Wenn also in den Kontrollpräparationen von Braun et al. (1986) ca. 70 % der Membranen die für Plasmalemma spezifische Färbung nicht ergeben, ist es nicht verwunderlich, daß in dieser Fraktion die Eigenschaften der Plasmalemma-ATPase nicht ausgebildet sind. Bei der Membranisolation aus salzbehandelten Pflanzen führten Braun et al. (1986) nach ihren Angaben keine Anpassung der Isolationspuffer an die nun völlig geänderten osmotischen Bedingungen in der Wurzel durch. Während des Aufschlusses von Gewebe, das eine Osmolarität von mehr als 700 mosmol/l aufweist, in einem Puffer mit ca. 280 mosmol/l muß es zwangsläufig zu einem osmotischen Schock kommen. Es ist anzunehmen, daß die in einem Saccharosedichtegradienten isolierten Membranen dann eine andere Zusammensetzung haben werden als bei den Kontrollpflanzen. Möglicherweise führten dann gerade diese Aufschlußbedingungen zu einem zufällig höheren Anteil von Plasmalemma in der geernteten Fraktion und damit zur vollen Ausbildung der biochemischen Eigenschaften der ATPase, wie sie von Kulturpflanzen bekannt sind. Aus den methodischen Angaben in dieser Arbeit

geht nicht hervor, ob die Autoren die tatsächlichen ATP-Konzentrationen in ihren kinetischen Analysen berechnet haben. Bei dem in ihrem Testansatz herrschenden pH von 5.8 liegen je nach Konzentration bis zu 50 % des ATP nicht als $MgATP^{2-}$ -Komplex vor. Nicht-korrigierte $MgATP^{2-}$ -Konzentrationen würden zu einer starken Verzerrung der Konzentrations-Achse ihrer Kinetik-Plots führen. Durch eine Korrektur der Konzentrationswerte ergäbe sich vermutlich im Gegensatz zu den Aussagen der Autoren zumindest für ihre salzbehandelten Pflanzen, möglicherweise aber auch für die Kontrollen wieder eine "normale" Michaelis-Menten-Kinetik.

In der Arbeit von Vakhmistrov et al. (1982) wurden Membranen aus Freiland-Sprossen des Halophyten *Halocnemum strobilaceum* von salinen Standorten aus "crude microsomes" über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten aus der 35 %/ 45 % Interphase geerntet. Diese ließen sich mit Phosphorwolframsäure zu ca. 10 % anfärben und zeigten etwa gleich hohe ATPase-Aktivität bei pH 6 und pH 8. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß auch diese Membranfraktion zu einem großen Teil nicht aus Plasmalemma bestand. Das von diesen Autoren herausgestellte Ergebnis eines synergistischen Stimulationseffektes von Na^+ und K^+ auf die Plasmalemma-ATPase ist daher meiner Ansicht nach nicht haltbar.

Wegen der hier diskutierten methodischen Mängel der einzigen bisher publizierten Arbeiten über die Eigenschaften nativer Plasmalemma-ATPase von salztoleranten höheren Pflanzen und Pilzen erscheint es angemessen, die genannten Ergebnisse über biochemische Unterschiede der Plasmalemma-ATPase zwischen Halophyten und Glykophyten in Zweifel zu ziehen. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen vielmehr, daß sich die nativen Plasmalemma-ATPasen aus salztoleranten und salzsensitiven Arten nur sehr wenig unterscheiden. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß in den Halophyten durch Salzbehandlung auch keine Änderungen der biochemischen Eigenschaften dieses Enzyms bewirkt wird oder Isoenzyme mit anderen Eigenschaften neu synthetisiert werden.

Aufgrund der makroskopischen Aufschlußtechnik können sich diese Aussagen naturgemäß nur auf das gesamte Plasmalemma von Wurzeln oder Blättern beziehen. Über einzelne, spezialisierte Zellschichten können in diesem Zusammenhang keine Angabe gemacht werden. Es

erscheint aber unwahrscheinlich, daß Änderungen in biochemischen Eigenschaften der ATPase beispielsweise der Xylemparenchym-Zellen überhaupt keinen Einfluß auf die makroskopisch ermittelten Eigenschaften haben sollen. weiterhin können sich Adaptationen an Salinität nicht nur in dieser Zellschicht bemerkbar machen, da sich zum Beispiel auch die Ionenaufnahme der Gesamtwurzel zwischen Halo- und Glykophyten drastisch unterscheidet. So nimmt die Wurzel von *Plantago media* unter 1 mM NaCl 10 meq Na⁺/kg Trockengewicht auf, während es bei *P. maritima* 80 meq Na⁺/kg Trockengewicht sind (DeBoer 1985). Bei diesen niedrigen Salzkonzentrationen kommt es also im Halophyten zu einer Akkumulation von Na⁺ über die im Medium herrschende Konzentration hinaus, ohne daß sich die K⁺-Aufnahme von der des Glykophyten unterscheidet. Ähnliche Ergebnisse konnten in Kap. 5.2.2. für die Gesamt-Na⁺-Aufnahme anhand der Na/K-Verhältnisse im Sproß in verschiedenen *Plantago*-Arten gezeigt werden. An der Na⁺-Akkumulation in der Wurzel unter niedrigen Salzbedingungen sind die Cortex-Zellen beteiligt (Harvey et al. 1986).

Eine Abgabe von Na⁺ in den Xylemsaft nach Erhöhung der Salinität des Mediums unter gleichzeitiger Acidifizierung des Xylemsaftes konnte DeBoer (1985) nur beobachten, wenn das Experiment an der intakten Pflanze vorgenommen wurde. Abgeschnittene Wurzeln zeigten diese Reaktion nicht. Daß dieselbe Änderung von pH und Na⁺-Gehalt durch Fusicoccin in perfundierten Wurzeln erzeugt werden konnte, bestätigt die These, daß diese Reaktion durch Stimulation der Plasmalemma-ATPase der Xylemparenchymzellen unter gleichzeitiger Öffnung von Na⁺-Kanälen oder Aktivierung von Na/K-Antiportern auf ein Signal vom Sproß hin erfolgte. über die Natur des Signals liegen noch keine Erkenntnisse vor; DeBoer vermutet hier ein zu Abscisinsäure antagonistisch wirkendes Hormon. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß sich die ATPase selber in den verschiedenen Arten nicht signifikant unterscheidet, muß man annehmen, daß die verschiedenen Reaktionen von *P. media* und *P. maritima* auf Unterschieden in anderen Komponenten des in Abb. 49 skizzierten Regelkreises liegen. Hierbei handelt es sich um ein hypothetisches Modell, das anhand von Daten von DeBoer (1985), Schulz (in Vorb.), Schröder (in Vorb.) und dieser Arbeit aufgestellt wurde.

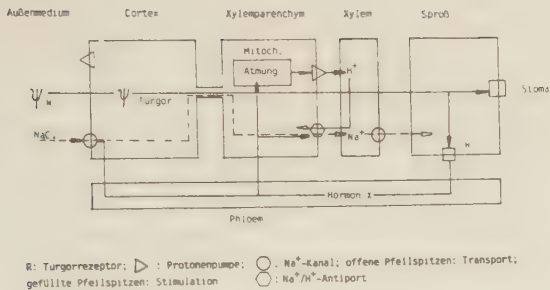


Abb. 49: Modell für die Regulation des Na^+ -Influsses in *P. maritima*.

Als Eingangssignal wird der osmotische Wert des die Wurzel umgebenden Mediums angenommen. Erhöhungen dieses Wertes wirken über Turgoränderungen in der Wurzel auf einen hypothetischen Turgorrezeptor im Sproß, der zunächst einmal zur Schließung der Stomata führt (Schulz in Vorb.) über das Phloem kann dann das zu Abscissinsäure antagonistisch wirkende Signal an die Wurzel gegeben werden, woraufhin die Plasmalemma-ATPase aktiviert wird. Da dieser Vorgang innerhalb weniger Minuten einsetzt, ist es unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um eine Neusynthese des Enzyms handelt. Die Aktivität der elektrogenen Pumpe am Xylem ist atmungsabhängig (DeBoer 1985). Die Regulation der ATPase-Aktivität könnte daher entweder durch eine Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses oder durch Senkung des cytoplasmatischen pH (durch erhöhte Atmungsaktivität) bewirkt werden. Schröder (MPI Göttingen, in Vorb.) konnte bei patch-clamp-Untersuchungen an Stoma-Schließzellen zeigen, daß durch Druckerhöhung in der Zelle ein zusätzlicher Ionenkanal im Plasmalemma aktiviert wird. Es ist durchaus vorstellbar, daß in den Wurzelzellen ein umgekehrtes System realisiert ist, d.h. daß durch Erhöhung des osmotischen Druckes der Umgebung und Turgorererniedrigung der Zellen ein zusätzlicher Na^+ -Kanal aktiviert wird, der zu einem verstärkten Na^+ -Influx in die Wurzel führt. Durch Kopplung der H^+ -Abgabe in das Xylem an ein Antiportsystem im Plasmalemma des Xylemparenchyms, das rückfließende Protonen gegen Na^+ austauscht, käme es dann zu einem gerichteten Transport vom Außenmedium ins Xylem.

Das geschilderte Modell erklärt die beobachtete Reaktion von *P. maritima* auf eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration im Medium. Zur Erklärung der Beobachtung, daß der Xylemsaft von Halophyten unter dauernd hohen Salzkonzentrationen im Medium wesentlich weniger Na^+ enthält als die Wurzelumgebung, sind andere Transporteigenschaften zu fordern. Harvey et al. (1986) konnten an *Plantago coronopus* zeigen, daß unter 110 mM NaCl im Kulturmedium die Wurzel von außen nach innen immer weniger Na^+ enthält, daß also das gesamte Rindenparenchym an einem aktiven Na^+ -Ausschluß beteiligt ist. Im gleichen Maße steigt der K^+ -Gehalt von Zellschicht zu Zellschicht von außen nach innen an. Es ist wahrscheinlich, daß die durch die Plasmalemma-ATPase bereitgestellte Energie für den Na/K-Austausch genutzt wird. Dieser beruht also nicht auf der Anwesenheit einer Na/K-ATPase wie bei tierischen Membranen, sondern vermutlich auf einem Na/K-Antiportsystem.

Für die weitere Aufklärung der Ursachen für das unterschiedliche Transportverhalten von Halophyten und Glykophyten werden elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Wurzelprotoplasten aus dem Xylemparenchym und dem Cortex von entscheidender Bedeutung sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Plasmalemma-ATPase auch in den Halophyten unter salinen und nicht salinen Bedingungen dieselben Eigenschaften zeigt wie in Glykophyten. Es ist daher zu erwarten, daß Unterschiede auf dem Niveau des Plasmalemmas im Bereich der Antiportsysteme und Ionenkanäle zu finden sein werden. Für diese Untersuchungen steht mit der patch-clamp-Technik eine neue, adäquate Methode zur Verfügung. Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode wird aber die Entwicklung von Techniken sein, mit denen sich definierte Zellschichten aus dem Wurzelgewebe, insbesondere auch aus dem Xylemparenchym isolieren lassen.

Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit befaßt sich mit der Isolation von Plasmalemma aus salztoleranten und salzsensitiven *Plantago*-Arten und der Charakterisierung und Aufreinigung der an diese Membran gebundenen ATPase. Untersuchungsobjekte waren die Glykophyten *P. major*, *P. lanceolata* und *P. media* und die Halophyten *P. maritima*, *P. coronopus* und *P. crassifolia*.

I. Es wurde eine geeigneten Isolationsmethode für das Plasmalemma aus Wurzeln und Blättern verschiedener *Plantago*-Arten entwickelt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt.

Durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation gelang es, eine mit Plasmalemma angereicherte Membranfraktion zu isolieren. Diese zeigte ATPase-Aktivität, war aber deutlich mit unspezifischer Phosphatase kontaminiert und enthielt außerdem signifikante Anteile an mitochondrialen Membranen.

Mit einem wäßrigen Zweiphasensystem, das bei tiefen Temperaturen von Polyethylenglykol und Dextran gebildet wird, wurde eine sehr viel reinere Plasmalemma-Präparation erhalten. Sie war frei von mitochondrialer und Tonoplasten-Kontamination und zeigte nur minimale Aktivitäten mit Golgi- und ER-Markerenzymen. Ihr Gehalt an unspezifischer Phosphatase war wesentlich niedriger als in den aus Dichtegradienten isolierten Membranen. Das mit diesem Verfahren isolierte Plasmalemma liegt in Form von "right-side-out"-Vesikeln vor und weist ATPase-Aktivität auf.

II. An salztoleranten und salzsensitiven *Plantago*-Arten wurden die Eigenschaften plasmalemmagebundener ATPasen untersucht. Die ATPase-Aktivität aus Wurzeln war in allen untersuchten Arten spezifisch für das Substrat ATP. Mit anderen Trinukleotiden und dem synthetischen Phosphatase-Substrat p-Nitrophenylphosphat wurden Aktivitäten von maximal 35 % der Kontrolle mit ATP erreicht.

Das Enzym benötigt für seine Aktivität die Anwesenheit von Mg^{2+} . Dieses Metall kann durch Mn^{2+} oder Co^{2+} ersetzt werden, alle anderen untersuchten zweiwertigen Kationen waren ineffektiv oder inhibierend. Insbesondere liefert Ca^{2+} keine Stimulation gegen-

über den Kontrollen ohne zweiwertiges Kation. Das Enzym zeigt Michaelis-Menten-Kinetik für das Substrat $MgATP^{2-}$ mit K_m -Werten von 0.23 bis 0.45 mM für sechs untersuchte Arten.

Die ATPase aus vier der untersuchten Arten zeigt in Anwesenheit von K^+ enge pH-Optima bei pH 6.0 bis 6.3, in zwei Arten wurden breitere Optima mit maximaler Aktivität bei pH 6.3 bis 6.5 gefunden. Eine Korrelation zwischen der Breite des pH-Optimums und der Salztoleranz der untersuchten Arten konnte nicht festgestellt werden. Die ATPase wird durch einwertige Kationen in der Reihenfolge $Cs^+ \geq K^+ \geq NH_4^+ > Na^+ > Li^+$ stimuliert. Dieser Effekt ist auf den pH-Bereich um pH 6.0 limitiert. Eine aus anderen Arten berichtete kooperative Stimulation durch Na^+ und K^+ , wie sie von der tierischen Na/K-ATPase bekannt ist, konnte nicht bestätigt werden.

Anionen beeinflussen die Enzymaktivität nicht mit Ausnahme von Fluorid und Citrat, die inhibierend wirken. Das Enzym wird weiterhin spezifisch durch Vanadat und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid gehemmt und reagiert nicht auf andere Phosphatase-Inhibitoren.

Zwischen der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln und Blättern konnten innerhalb einer Art keine biochemischen Unterschiede festgestellt werden. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß die plasmalemmagebundene ATPase innerhalb des Genus *Plantago* ein konservatives Enzym ist. Sie gleicht in ihren Eigenschaften den an Kulturpflanzen untersuchten H^+ -ATPasen aus Plasmalemma, weist aber etwas niedrigere pH-Optima auf als in den meisten anderen untersuchten Arten. Da in den halophytischen *Plantago*-Arten keine abweichenden oder zusätzlichen Eigenschaften plasmalemmagebundener ATPasen gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, daß die Plasmalemma-ATPase auch in diesen Arten dieselbe Funktion wie in den untersuchten Kulturpflanzen hat. Ihre Aufgabe besteht demnach ausschließlich in der Energetisierung des Plasmalemmas für Ionen-transport durch Erzeugung eines Protonengradienten.

Unter salinen Kulturbedingungen konnten keine Änderungen in den biochemischen Eigenschaften der ATPase-Aktivität aus salztoleranten Arten entdeckt werden. Die physiologische Adaptation von Halophyten an saline Bedingungen beinhaltet also keine Ausbildung einer zusätzlichen Transport-ATPase. Insbesondere konnte kein

Hinweis auf die Ausbildung einer Ouabain-sensitiven Na/K-ATPase festgestellt werden.

III. Durch eine schrittweise Wasch- und Solubilisationsmethode gelang es, die ATPase-Aktivität in *P.maritima*, *P.crassifolia* und *P.lanceolata* von aller kontaminierenden Phosphatase-Aktivität zu befreien.

Die biochemischen Analysen des solubilisierten Enzyms bestätigten die im nativen Zustand erhaltenen Ergebnisse. Im Falle von *P.coronopus* und *P.major* ssp. *pleiosperma* enthielten die solubilisierten Enzyme keine p-Nitrophenylphosphatase-Aktivität mehr, zeigten aber auch mit anderen Trinukleotiden als ATP noch enzymatische Aktivität. Vermutlich enthalten diese Präparationen noch eine kontaminierende Phosphatase-Aktivität, die auch für das breitere pH-Optimum der nativen ATPase in *P.coronopus* und *P.crassifolia* verantwortlich ist.

Alle solubilisierten Enzympräparationen mit Ausnahme von dreien zeigten in der elektrophoretischen Analyse drei Banden bei ca. 29, 55 und 105 kD. Bei den Präparationen aus Wurzeln von *P.maritima* war im 100 kD-Bereich durch eine sehr breite Bande bei 90 kD die 105 kD-Bande nicht zu erkennen. Da Blattpräparationen aus dieser Art beide Polypeptide enthielten (90 und 105 kD), wird angenommen, daß dies auch in den Wurzeln der Fall ist.

In der elektrophoretischen Analyse konnten ebenso wie in der biochemischen keinerlei Unterschiede zwischen salzbehandelten und Kontrollpflanzen der halophytischen Arten festgestellt werden. Nach Literaturvergleich ist es wahrscheinlich, daß die 105 kD-Bande die Plasmalemma-ATPase repräsentiert.

Da die Plasmalemma-ATPase innerhalb des Genus *Plantago* in ihren biochemischen Eigenschaften sehr konservativ ist und auch unter salinen Kulturbedingungen keine Änderungen zeigt, wird geschlossen, daß für das unterschiedliche Ionenaufnahme- und -transportverhalten der salttoleranten und -sensitiven *Plantago*-Arten andere Membranbestandteile verantwortlich sind. In erster Linie sind hier Kationenkanäle und eventuell Na/H-Antiportsysteme zu nennen.

Literatur

- Ahmad, I., Larher, F. und Stewart, G.R. (1979): Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. New Phytol. 82:671-678
- Albert, R. und Popp, M. (1977): Chemical composition of halophytes from the Neusiedler lake region in Austria. Oecologia. 27:157-170
- Albert, R. und Popp, M. (1978): Zur Rolle der löslichen Kohlenhydrate in Halophyten des Neusiedlersee-Gebietes (österreich). Oecol. Plant. 13:27-42
- Ali, M.S. und Akazawa, T. (1986): Association of H^+ -translocating ATPase in the Golgi membrane system from suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). Plant Physiol. 81:222-227
- Axel, L.M. und Pedersen, P.L. (1983): Proton ATPases: structure and mechanism. Ann. Rev. Biochem. 52:801-824
- Anthon, G.E. und Spanswick, R.M. (1986): Purification and properties of the H^+ -translocating ATPase from the plasma membrane of tomato roots. Plant Physiol. 81:1080-1085
- Blair, J. McD. (1970): Magnesium, potassium and the adenylate kinase equilibrium. Eur. J. Biochem. 13:384-390
- Blom, C.W.P.M. (1976): Effects of trampling and soil compaction on the occurrence of some *Plantago* species in coastal sand dunes. I. Soil compaction, soil moisture and seedling emergence. Oecol. Plant. 11:225-241
- Blumwald, E. und Poole, R.J. (1985): Na^+/H^+ -antiport in isolated tonoplast vacuoles from storage tissue of *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 78:163-167
- Boller, T. und Kende, H. (1979): Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. Plant Physiol. 63:1123-1132
- Bowman, B.J., Blasco, F. und Slayman, C.W. (1981): Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 256:12343-12349
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. Anal. Biochem. 72:248-254
- Braun, Y., Hassidim, M., Lerner, H.R. und Reinhold, L. (1986): Studies on H^+ -translocating ATPases in plants of varying resistance to salinity. I. Salinity during growth modulates the

- proton pump in the halophyte *Atriplex nummularia*. Plant Physiol. 81:1050-1056
- Briskin, D.P. (1986): Plasma membrane H⁺-transporting ATPase: Role in potassium transport? Physiol. Plant. 68:159-163
- Briskin, D.P. und Poole, R.J. (1983): Evidence for a β -aspartyl phosphate residue in the phosphorylated intermediate of the red beet plasma membrane ATPase. Plant Physiol. 72:1133-1135
- Briskin, D.P., Thornley, W.R. und Roti-Roti, J.L. (1985): Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. Plant Physiol. 78:642-644
- Brosius, B. (1984): Einfluß von Lipidmembranen auf die Konformationsübergänge von Nukleinsäuren. Dissertation. Universität Düsseldorf
- Buckhout, T.J. (1984): Characterization of Ca²⁺ transport in purified endoplasmic reticulum membrane vesicles from *Lepidium sativum* L. roots. Plant Physiol. 76:962-967
- Buddecke, E. (1984): Grundriß der Biochemie. 7. Auflage. de Gruyter, Berlin, New York. p.441
- Cantley, L.C. (1981): Structure and mechanism of the (Na,K)-ATPase. Curr. Top. Bioenerg. 11:201-237
- Chanson, A., Fichmann, J., Spear, D. und Taiz, L. (1985): Pyrophosphate-driven proton transport by microsomal membranes of corn coleoptiles. Plant Physiol. 79:159-164
- Chanson, A., McNaughton, E. und Taiz, L. (1984): Evidence for a KCl-stimulated, Mg²⁺-ATPase on the Golgi of corn coleoptiles. Plant Physiol. 76:498-507
- Churchill, K.A. und Sze, H. (1983): Anion-sensitive, H⁺-pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots. Plant Physiol. 71:610-617
- Cocucci, M.C. und Marre, E. (1984): Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate-inhibited, MgATPase from radish microsomes. Biochim. Biophys. Acta. 771:42-52
- Cocucci, M.C., DeMichelis, M.I., Pugliarello, M.C. und Rasi-Caldogno, F. (1985): Reconstitution of proton pumping activity of a plasma membrane ATPase purified from radish. Plant Sci. Lett. 37:189-193
- Comerford, J.G., Spencer-Phillips, P.T.H. und Jennings, D.H. (1985): Membrane-bound ATPase activity, properties of which are altered by growth in saline conditions, isolated from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. Trans. Br. Mycol. Soc. 85:431-438
- DeBoer, B. (1985): Xylem/symplast exchange: mechanism and function

- in salt-tolerance and growth. PhD thesis. University of Groningen, the Netherlands
- Douglas, T.J. (1985): NaCl effects on 4-desmethylsterol composition of plasma-membrane-enriched preparations from citrus roots. *Plant Cell Environ.* 8:687-692
- Erdei, L. und Kuiper, P.J.C. (1979): The effect of salinity on growth, cation content, Na^+ -uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol. Plant.* 47:95-99
- Erdei, L. und Kuiper, P.J.C. (1980): Substrate-dependent modulation of ATPase activity by Na^+ and K^+ in roots of *Plantago* species. *Physiol. Plant.* 49:71-77
- Erdei, L., Stuiver, B. und Kuiper, P.J.C. (1980): The effect of salinity on lipid composition and on activity of Ca^{2+} stimulated and Mg^{2+} stimulated ATPase in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol. Plant.* 49:315-319
- Flowers, T.J. (1972): Salt tolerance in *Suaeda maritima* (L.) Dum. The effect of sodium chloride on growth, respiration and soluble enzymes in a comparative study with *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.* 23:310-321
- Flowers, T.J. (1985): Physiology of halophytes. *Plant and Soil* 89: 41-56
- Gallagher, S.R. und Leonard, R.T. (1982): Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* 70:1335-1340
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Boesken, W.H. und Schiwara, H.W. (1983): Horizontale SDS-Elektrophorese in ultradünnen Gradientengelen zur Differenzierung von Urinproteinen. Application Note. LKB Producter Germany, Postfach 1369, 8032 Gräfelfing
- Gorham, J. und WynJones, R.G. (1983): Solute distribution in *Suaeda maritima*. *Planta* 157:344-349
- Gorham, J., Hughes, L.I. und WynJones, R.G. (1981): Low-molecular-weight carbohydrates in some salt-stressed plants. *Physiol. Plant.* 53:27-33
- Greenway, H. und Osmond, C.B. (1970): Ion relations, growth and metabolism of *Atriplex* at high, external, electrolyte concentrations. In: *The Biology of Atriplex*. ed. R. Jones. Canberra, CSIRO. pp.49-56
- Harvey, D.M.R., Stelzer, R., Brandtner, R. und Kramer, D. (1986): Effects of salinity on ultrastructure and ion distribution in

- roots of *Plantago coronopus*. *Physiol.Plant.*66:328-338
- Hill,A.E. und Hill, B.S. (1973a): The electrogenic chloride pump of *Limonium* salt gland. *J.Membr.Biol.*12:129-144
- Hill,B.S. und Hill,A.E. (1973b): ATP-driven chloride pumping and ATPase activity in the *Limonium* salt gland. *J.Membr.Biol.* 12: 145-158
- Hodges,T.K. (1976): ATPases associated with membranes of plant cells. in: *Encyclopedia of Plant Physiology* (Pirson,A. und Zimmermann,M.H., eds.). Vol 2A. Springer, Heidelberg. pp.260-283
- Hodges,T.K. und Leonard,R.T. (1972): Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. *Meth.Enzymol.*32:392-406
- Imbrie,C.W. und Murphy,T.M. (1984): Solubilization and partial purification of ATPase from a rose cell plasma membrane fraction. *Plant Physiol.*74:611-616
- Janiesch,P. (1981): Ökophysiologische Untersuchungen an *Carex*-Arten aus Erlenbruchwäldern. Habilitationsschrift, Fachbereich Biologie, Universität Münster
- Kaiser,G., Martinoia,E., Scheitt,J.N., Mincha,D.K. und Heber,U. (1986): Polypeptide patterns and enzymic character of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta.*169:345-355
- Karlson,P. (1977): *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. Thieme, Stuttgart
- Kasano,K. (1986): Purification and properties of the plasma membrane H^+ -translocating adenosine triphosphatase of *Phaseolus mungo* roots. *Plant Physiol.*80:818-824
- Khan,M.M.T. und Martell,A.E. (1966): Thermodynamic quantities associated with the interaction of adenosine triphosphate on metal ions. *JACS.*88:668-671
- Kuiper,D. und Kuiper,P.J.C. (1979a): Ca^{2+} - and Mg^{2+} -stimulated ATPases from roots of *Plantago major* and *Plantago maritima*: response to alterations of the level of mineral nutrition and ecological significance. *Physiol.Plant.*45:1-6
- Kuiper,D. und Kuiper,P.J.C. (1979b): Ca^{2+} - and Mg^{2+} -stimulated ATPases from roots of *Plantago lanceolata*, *Plantago media* and *Plantago coronopus*: response to alterations of the level of mineral nutrition and ecological significance. *Physiol. Plant.*45:240-244
- Kuiper,D. und Staal,M. (1986): Genetic differentiation and phenotypic plasticity in *Plantago major* ssp. *major*. II. The effect of

- differences in level of irradiance on Mg^{2+} - and Ca^{2+} -stimulated ATPase activity from roots and shoot. *Physiol.Plant.* 66:674-678
- Larsen, H. (1967): Biochemical aspects of extreme halophilism. *Adv.Microb.Physiol.* 1:97-132
- Larsson, C., Kjellbom, P., Widell, S. und Lundborg, T. (1984): Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems. *FEBS Lett.* 171:271-276
- Lehninger, A.L. (1979): *Biochemie*. 2.Aufl. Verlag Chemie, Weinheim, New York
- Leonard, R.T. (1984): Membrane associated ATPases and nutrient absorption by roots. in: *Advances in Plant Nutrition*. Tinker, P.B. und Lauchi, A., eds. Vol.I. Praeger Scientific, New York. pp.209-240
- Leonard, R.T. (1985): Absorption of potassium into root cells. in: *Potassium in agriculture* (Munson, R.D., ed.). Am.Soc.Agron., Madison, WI. pp.327-335
- Lerner, H.R., Reinhold, L., Guy, R., Braun, Y., Hassidim, M. und Poljakoff-Mayber, A. (1983): Salt activation and inhibition of membrane ATPase from roots of the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Cell Environ.* 6:501-506
- Loescher, W.H., Marlow, G.C. und Kennedy, R.A. (1982): Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiol.* 70:335-339
- Lüttge, U., Jochem, P., Smith, J.A.C. und Uribe, E.G. (1984): Membrane transport in CAM plants. in: Cram, W.J. et al. (eds.): *Membrane transport in plants*. New York, pp. 359-364
- Lundborg, T., Widell, S. und Larsson, C. (1981): Distribution of ATPases in wheat root membranes separated by phase partition. *Physiol.Plant.* 52:89-95
- Maddy, A.H. und Dunn, M.J. (1976): The solubilization of membranes. in: *Biochemical analysis of membranes*. Maddy, A.H. (ed.). New York
- Mandala, S., Mettler, I.J. und Taiz, L. (1982): Localization of the proton pump of corn coleoptile microsomal membranes by density gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 70:1743-1747
- Marre, E., Beggagna, N. und Romani, G. (1987): Potassium transport and regulation of intracellular pH in *Elodea densa* leaves. *Bot.Acta.* 101:17-23
- Martinoia, E., Flügge, U.I., Kaiser, G., Heber, U. und Heldt, H.W. (1985): Energy-dependent uptake of malate into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Biochim.Biophys.Ac-*

- Match, T., Watanabe, J. und Takahashi, E. (1987): Sodium, potassium, and betaine concentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol.* 84:173-177
- McCarty, D.R., Keegstra, K. und Selman, B.R. (1984): Characterization and localization of the ATPase associated with pea chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol.* 76:584-588
- Memon, A.R., Sommarin, M. und Kylin, A. (1987): Plasmalemma from the roots of cucumber: isolation by two-phase partitioning and characterization. *Physiol. Plant.* 69:237-243
- Michal, G. (1982): *Biochemical Pathways*. Boehringer Mannheim GmbH, FRG
- Mitchell, P. (1966): Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 41:445-502
- Moog, P. (1985): Einfluß aerober und anaerober Substratbedingungen auf das Wachstum von *Carex remota* unter besonderer Berücksichtigung der Produktion organischer Säuren. Diplomarbeit, Universität Oldenburg
- Napp-Zinn, K. (1984): Experimentelle und ökologische Anatomie des Angiospermenblattes. Band VIII. Teil 2 B, erste Lieferung von: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Braun, H.J. et al. (eds.). Borntraeger, Berlin, Stuttgart
- Negg, F.B. und Loescher, W.H. (1981): Characterization of aldose 6-phosphate reductase (alditol 6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. *Plant Physiol.* 67:139-142
- O'Neill, S.D. und Spanswick, R.M. (1984a): Solubilization and reconstitution of a vanadate-sensitive H^+ -ATPase from the plasma membrane of *Beta vulgaris*. *J. Membr. Biol.* 79:231-243
- O'Neill, S.D. und Spanswick, R.M. (1984b): Characterization of native and reconstituted plasma membrane H^+ -ATPase from the plasma membrane of *Beta vulgaris*. *J. Membr. Biol.* 79:245-256
- Petraglia, T. und Poole, R.J. (1980): ATP levels and their effects on plasmalemma influxes of potassium chloride in red beet. *Plant Physiol.* 65:967-972
- Phillips, R.C., George, S.J.P. und Rutman, R.J. (1966): Thermodynamic studies of the formation and ionization of the magnesium (II) complexes of ADP and ATP over the pH range 5 to 9. *JACS.* 88:2631-2640
- Pignatti, S. (ed.) (1982): *Flora d'Italia*. Vol. II. Bologna. p. 361
- Poole, R.J., Briskin, D.P., Kratky, Z. und Johnstone, R.M. (1984):

- Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. *Plant Physiol.* 74:549-556
- Rasi-Caldogno, F. und Pugliarello, M.C. (1985): Fusicoccin stimulates the H^+ -ATPase of plasmalemma in isolated membrane vesicles from radish. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 133:280-285
- Rasi-Caldogno, F., Pugliarello, M.C. und DeMichelis, M.I. (1985): Electrogenic transport of protons driven by the plasma membrane ATPase in membrane vesicles from radish. *Plant Physiol.* 77: 873-876
- Raven, J.A. und Smith, F.A. (1979): Intracellular pH and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:289-311
- Rodriguez-Navarro, A., Blatt, M.R. und Slayman, C.L. (1986): A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* 87:649-674
- Roland, J.C. (1972): Phosphotungstic acid-chromic acid as a selective electron dense stain for plasma membranes of plant cells. *Stain Technol.* 47:195-200
- Roos, W. und Slavik, J. (1987): Intracellular pH-topography of *Penicillium cyclopius* protoplasts: Mechanisms of pH maintenance. XIV International Botanical Congress, 24.7.-1.8.1987. Berlin. Abstracts
- Rothmaler, W. (ed.) (1987): Exkursionsflora. Gefäßpflanzen, Kritischer Band. Volk und Wissen VEB, Berlin
- Sagar, J.R. und Harper, J.L. (1964): Biological Flora of the British Isles. *Plantago major*, *Plantago lanceolata* and *Plantago media*. *J. Ecol.* 52:189-221
- Schmidt, M. (1969): Anorganische Chemie, I und II. Bibliographisches Institut. Mannheim, Wien, Zürich. Hochschultaschenbücher 86 und 150
- Schulz, F. (1987): Einfluß kurzfristiger Salinitätsschwankungen auf den Wasserhaushalt von *Plantago lanceolata* und *Plantago maritima*. Diplomarbeit, Universität Oldenburg
- Schumaker, K.S. und Sze, H. (1985): A Ca^{2+}/H^+ antiport system driven by the proton electrochemical gradient of a tonoplast H^+ -ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* 79:1111-1117
- Serrano, R. (1984a): Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. in Cellular Regulation.* 23:87-126

- Serrano, R. (1984b): Purification of the proton pumping ATPase from plant plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 121:735-740
- Smith, J.A.C., Uribe, E.G., Ball, E., Heuer, S. und Lüttge, U. (1984): Characterization of the vacuolar ATPase activity of the crassulacean-acid-metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. Receptor modulating. *Eur. J. Biochem.* 141:415-420
- Smith, R.M. und Martell, A.E. (1976): Critical stability constants. Vol. IV: Inorganic ligands. Plenum Press, New York
- Solios, M. (1984): Dicyclohexylcarbodiimide as a novel probe for proton translocating enzymes. *TIBS*. July. 309-312
- Sommarin, M., Lundborg, T. und Kylin, A. (1985): Comparison of K, Mg-ATPases in purified plasmalemma from wheat and oat. - Substrate specificities and effects of pH, temperature and inhibitors. *Physiol. Plant.* 65:27-32
- Staal, M., Hommels, C. und Kuiper, D. (1987): Characterization of the plasmalemma ATPase activity from roots of *Plantago major* ssp. *pleiosperma*, purified by the two-phase partitioning method. *Physiol. Plant.* 70:461-466
- Stewart, G.R. und Lee, J.A. (1974): The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*. 120:279-289
- Storer, A.C. und Cornish-Bowden, A. (1976): Concentration of $MgATP^{2-}$ and other ions in solution. *Biochem. J.* 159:1-5
- Storey, R., Ahmad, M. und Wyn Jones, R.G. (1977): Taxonomic and ecological aspects of the distribution of glycine-betaine and related compounds in plants. *Oecologia*. 27:319-332
- Sussman, M.R. und Slayman, C.W. (1983): Modification of the *Neurospora crassa* plasma membrane (H^+)-ATPase with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 258:1839-1843
- Sze, H. (1984): H^+ -translocating ATPases of plasma membrane and tonoplast of plant cells. *Physiol. Plant.* 61:683-691
- Sze, H. (1985): H^+ -translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:175-208
- Thom, M. und Komor, E. (1984): Role of the ATPase of sugar-cane vacuoles in energization of the tonoplast. *Eur. J. Biochem.* 138:93-99
- Tutin, T.G. (ed.) (1976): *Flora Europaea*. Vol. IV. Cambridge, UK, pp. 40-41
- Uemura, M. und Yoshida, S. (1983): Isolation and identification of plasma membrane from light-grown winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiol.* 73:586-597

- Uemura, M. und Yoshida, S. (1986): Studies on freezing injuries in plant cells. II. Protein and lipid changes in the plasma membrane of Jerusalem artichoke tubers during a lethal freezing *in vivo*. *Plant Physiol.* 80:187-195
- Vara, F. und Serrano, R. (1982): Partial purification and properties of the proton-translocating ATPase of plant plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 257:12826-12830
- Vara, F. und Serrano, R. (1983): Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 258:5334-5336
- Vakhmistrov, D. B., Tikhaya, N. I. und Mishustina, N. E. (1982): Characterization of membrane-bound Na, K, Mg-ATPase from tissues of *Hordeum vulgare* L. and *Halocnemum strobilaceum* L. *Physiol. Plant.* 55:155-160
- Walker, R. R. und Leigh, R. A. (1981a): Characterisation of a salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles isolated from storage tissue of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta.* 153:140-149
- Walker, R. R. und Leigh, R. A. (1981b): Mg-dependent, cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta.* 153:150-155
- Wang, J. H. (1983): Coupling of proton flux to the hydrolysis and synthesis of ATP. *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* 12:21-34
- Wang, Y. und Sze, H. (1985): Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPases of oat roots. *J. Biol. Chem.* 260:10434-10443
- Widell, S., Lundborg, T. und Larsson, C. (1982): Plasma membranes from oat prepared by partition in an aqueous polymer two-phase system. *Plant Physiol.* 70:1429-1435
- Wingstrand, G. (1985): Characterization of membrane-bound MgATPases, purified by aqueous two-phase partitioning, from young sugar beet roots. *Physiol. Plant.* 64:223-229
- Yoshida, S., Uemura, M., Niki, T., Sakai, A. und Gusta, L. V. (1983): Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. *Plant Physiol.* 72:105-114
- Yoshida, S. und Uemura, M. (1984): Protein and lipid compositions of isolated plasma membranes from Orchard Grass (*Dactylis glomerata* L.) and changes during cold acclimation. *Plant Physiol.* 75:31-37
- Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. und Niki, T. (1986a): Properties

of plasma membrane isolated from chilling-sensitive etiolated seedlings of *Vigna radiata*. Plant Physiol. 80:152-160

Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. und Niki, T. (1986b): Isolation and characterization of tonoplast from chilling-sensitive etiolated seedlings of *Vigna radiata*. Plant Physiol. 80:161-166

Ziegler, H. (1978): Physiologie. in: Strasburger, E. et al.: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Jena

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DDC	Deoxycholat
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektor
GTP	Guanosintriphosphat
LP	L- α -Lysophosphatidylcholin
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
PP _i	Pyrophosphat
SDS	Na-Dodecylsulfat
t _{ret}	Retentionszeit
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Modell der Transportsysteme in einer Pflanzenzelle, ohne Berücksichtigung von Mitochondrien, Chloroplasten, Kern und Mikrobodies (modifiziert nach Sze 1984)

Abb.2: Modell der F_0 - F_1 -ATPase (Amzel und Pedersen 1983)

Abb.3: Vorschlag für den Mechanismus der ATP-Hydrolyse durch F_0 - F_1 -ATPasen (Wang 1983)

Abb.4: pH-Abhängigkeit der ATPase-Spaltung durch lösliche Phosphatase aus Blättern von *Plantago lanceolata* und *P.maritima*

Abb.5: Substratabhängigkeit der ATP-Spaltung durch lösliche Phosphatase aus Blättern von *P.lanceolata* und *P.maritima*.

Abb.6: Hemmung der ATP-Hydrolyse durch lösliche Phosphatase aus Blättern von *P.lanceolata* mit Na_2MoO_4 .

Abb.7: Verteilung von Membranen aus Blättern von *P.maritima* in einem diskontinuierlichen Sorbitol/Saccharose-Dichtegradienten

Abb.8: Schematische Darstellung der Verteilung von Membranen im diskontinuierlichen Dichtegradienten

Abb.9: Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Aktivität in Mikrosomen aus Fraktion I

Abb.10: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in Mikrosomen aus Fraktion I des diskontinuierlichen Dichtegradienten.

Abb.11: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Vanadat in Mikrosomen aus einem diskontinuierlichen Dichtegradienten mit Membranen aus Blättern von *P.maritima*.

Abb.12: Einfluß von Na_3VO_4 und DCCD auf die ATPase-Aktivität in Mikrosomen aus Fraktion I und Fraktion III eines diskontinuierlichen Dichtegradienten mit Mikrosomen aus Blättern von *P.maritima*.

Abb.13: Einfluß von KCl auf die Konzentration von Protein und ATPase in der Oberphase eines Zweiphasensystems mit 5.6.% Polymerkonzentration anhand von "crude microsomes" aus Blättern und Wurzeln von *P.lanceolata*.

Abb.14: Zweiphasensystem mit "crude microsomes" aus Blättern von *P.lanceolata* nach der Phasentrennung.

Abb.15: Einfluß von TRITON X-100 auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma-Vesikeln aus Wurzeln von *P.lanceolata*.

Abb.16: Einfluß von Na_3VO_4 und DCCD auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma-Vesikeln aus Wurzeln von *P.lanceolata* und *P.maritima*.

Abb.17: Einfluß des pH-Wertes auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma aus Wurzeln von *P.lanceolata*, *P.major* ssp. *major*, *P.maritima*, *P.coronopus*, *P.media* und *P.crassifolia*.

Abb.18: Einfluß des pH-Wertes auf die ATPase-Aktivität in Plasmalemma aus Blättern von *P.lanceolata*, *P.major* ssp. *major* und *P.maritima*.

Abb.19: pH-Abhängigkeit der ATPase-Stimulation durch KCl in Plasmalemma aus *P.lanceolata*-Wurzeln.

Abb.20: Stimulation der Plasmalemma-ATPase durch KCl und NaCl in Präparationen aus Wurzeln von *P.lanceolata*, *P.major* ssp. *major*, *P.maritima* und *P.coronopus*.

Abb.21: Stimulation der membrangebundenen ATPase durch KCl und NaCl in Blatt-Plasmalemma aus *P.maritima*.

Abb.22: Stimulation der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.coronopus* durch K_2SO_4 und Na_2SO_4 .

Abb.23: Einfluß kombinierter Addition von KCl und NaCl auf die Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.lanceolata* und *P.maritima*.

Abb.24: Konzentrationsabhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P.lanceolata*, *P.major* ssp. *major*, *P.maritima*, *P.coronopus*, *P.media* und *P.crassifolia*.

Abb.25: Reaktion von DCCD mit sauren Aminosäuren (nach Solioz 1984).

Abb.26: Nukleophile Addition von Vanadat an die Aspartat-Carboxylfunktion.

Abb.27: Modell für die Struktur des MgATP²⁻-Komplexes mit einem koordinierten H₂O.

Abb.28: Gaschromatogramm der löslichen Kohlenhydrate und Polyole aus Wurzeln von salzbehandelten *P. crassifolia*.

Abb.29: Massenspektren des Hauptpeaks aus Abb.28 und von Sorbitol-Hexa-TMS.

Abb.30: pH-Abhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln und Blättern von *P. maritima*-Kontroll- und salzbehandelten Pflanzen.

Abb.31: pH-Abhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P. crassifolia*-Kontroll- und salzbehandelten Pflanzen

Abb.32: Konzentrationsabhängigkeit der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten (200 mM NaCl) *P. maritima*.

Abb.33: Stimulation der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von salzbehandelten (75 mM NaCl) *P. coronopus* durch KCl und NaCl.

Abb.34: Stimulation der Plasmalemma-ATPase aus Wurzeln von *P. maritima* durch KCl und NaCl.

Abb.35: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in löslichen und unlöslichen Fraktionen aus Plasmalemma von *P. coronopus*-Wurzeln.

Abb.36: SDS-PAGE von Octylglucosid/DOC-löslichen Membranproteinen aus dem Plasmalemma von *P. coronopus*-Wurzeln und -Blättern.

Abb.37: pH-Abhängigkeit der Lysophosphatidylcholin-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. major* ssp. *major* Wurzeln

Abb.38: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. major* ssp. *pleiosperma* Wurzeln.

Abb.39: SDS-PAGE von LP-löslichen Proteinen aus Plasmalemma von *P. major* ssp. *pleiosperma* Wurzeln.

Abb.40: pH-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in der KBr/TRITON-, Octylglucosid/DDC- und LP-löslichen Fraktion aus Plasmalemma von *P. maritima* Wurzeln.

Abb.41: SDS-PAGE der löslichen Fraktionen aus Plasmalemma von *P. maritima*-Wurzeln.

Abb.42: pH-Abhängigkeit der LP-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. crassifolia*-Blättern.

Abb.43: pH-Abhängigkeit der LP-löslichen ATPase aus Plasmalemma von *P. maritima* und *P. lanceolata*.

Abb.44: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen Plasmalemma-ATPase aus Blättern von *P. crassifolia*.

Abb.45: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen Plasmalemma-ATPase aus Blättern und Wurzeln von *P. maritima*.

Abb.46: Konzentrationsabhängigkeit der LP-löslichen Plasmalemma-ATPase aus Blättern von *P. lanceolata*.

Abb.47: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Proteine aus Blatt-Plasmalemma von *P. crassifolia*.

Abb.48: SDS-PAGE der LP-löslichen Proteine aus Plasmalemma von *P. maritima* und *P. lanceolata*.

Abb.49: Modell für die Regulation des Na⁺-Influxes in *P. maritima*.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Oldenburg, den 28.9.1987

W. Beja

Lebenslauf

Name: Wolfgang Heinrich Brüggemann

Geboren: 20.10.1956 in Aachen

Vater: Heinz-Egon Brüggemann, Dipl.-Ing.

Mutter: Johanna Elisabeth Brüggemann, geb. Wahnrauths,
Hauswirtschaftsmeisterin

Volksschule: 1963-66 Katholische Volksschule Essener Str.,
Düsseldorf

Gymnasium: 1966-75 Leibniz-Gymnasium, Scharnhorststr.,
Düsseldorf

Abitur: 4.6.1975

Studium: WS 75 - SS 82 Studium der Chemie, Philosophie und
Biologie an der Universität Düsseldorf
SS - WS 84 Studium der Chemie an der Universität
Oldenburg
6.10.1978 Vordiplom Chemie
14.2.1979 Vordiplom Biologie
26.8.1982 Diplom Biologie
22.1.1985 Diplom Chemie
1.3.1980 - 31.8.1982 Stipendiat der Studienstiftung
des deutschen Volkes

Dissertation: 1.8.1985 - 30.9.1987 im Fachbereich Biologie der
Universität Oldenburg, AG Physiologische Ökologie,
bei Prof. Dr. P. Janiesch
1.1.1986 - 30.9.1987 Promotionsstipendium der Studien-
stiftung
6.11.1987 Tag der Disputation

Zivildienst: 4.10.1982 - 1.2.1984

